

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有權機關
國際事務局



(43) 国際公開日
2004年7月29日 (29.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/063369 A1

541822

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, 1/21, 9/90
(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/000131
(22) 国際出願日: 2004 年 1 月 9 日 (09.01.2004)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願2003-005041 2003 年 1 月 10 日 (10.01.2003) JP
特願2003-096046 2003 年 3 月 31 日 (31.03.2003) JP
特願2003-299371 2003 年 8 月 22 日 (22.08.2003) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 香川大学
長が代表する日本国 (JAPAN REPRESENTED BY

PRESIDENT OF KAGAWA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7608521 香川県高松市幸町1-1 Kagawa (JP).

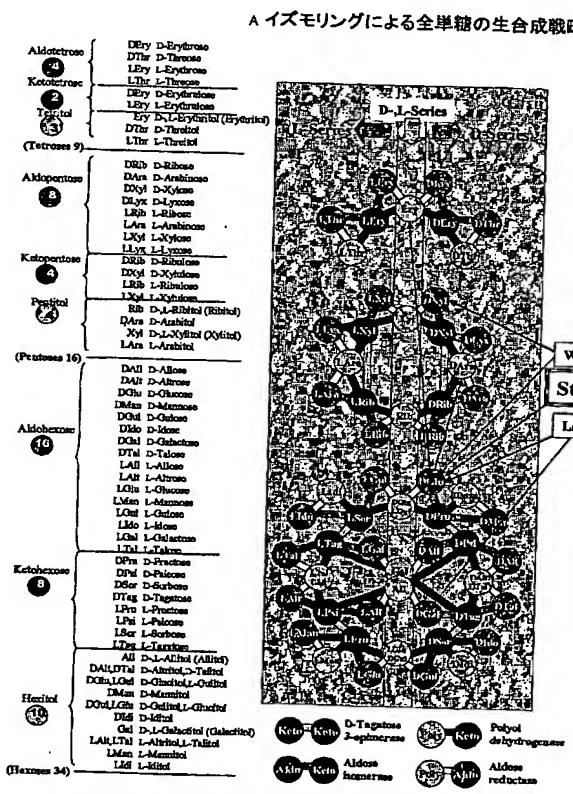
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 何森 健 (IZU-MORI, Ken) [JP/JP]; 〒7618078 香川県高松市仏生山町甲 1015 番地 14 Kagawa (JP). 高田 悟郎 (TAKADA, Goro) [JP/JP]; 〒7618053 香川県高松市西ハゼ町 64-4 Kagawa (JP). 德田 雅明 (TOKUDA, Masaaki) [JP/JP]; 〒7618071 香川県高松市伏石町 596-505 Kagawa (JP).

(74) 代理人: 須藤 阿佐子, 外(SUDO, Asako et al.); 〒1840002 東京都小金井市梶野町 5-6-26 Tokyo (JP).

〔統葉有〕

(54) Title: GENE SEQUENCE OF L-RHAMNOSE ISOMERASE HAVING NEW CATALYTIC FUNCTION AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 新しい触媒機能を有するレーラムノースインメラーザの遺伝子配列およびその用途



(57) Abstract: In the rare sugar strategy of Izumoring (Fig. 1), it is intended to establish a reaction system of producing rare sugars of many types by acquiring an isomerase which acts various rare aldoses and, therefore, is most efficient in producing various rare ketoses. A DNA encoding the following protein (a) or (b). The above DNA which is L-rhamnose isomerase originating in *Pseudomonas stutzerii*. A protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2. A process for producing a recombinant protein characterized by comprising culturing host cells containing an expression system allowing the expression of the above-described protein in a medium and collecting a recombinant protein having L-rhamnose isomerase activity from the thus obtained culture medium. A method of applying Fig. 1 to the production of a rare sugar characterized in that the location of a target rare sugar in the overall map of monosaccharides is understood and thus the optimum production pathway for the treatment of the above protein is designed.

(57) 要約: イズモリング(第1図)の希少糖戦略の中で、多種類の希少アルドースに作用し、多種類の希少ケトースを生産するために最も効率のよいイソメラーゼを得ることによって、多種類の希少糖を生産する反応系を確立すること。以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。*Pseudomonas stutzeri*由来のL-ラムノースイソメラーゼである上記のDNA。配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。上記のタンパク質を発現することができる発現系を含んでいる宿主細胞を培地に培養し、得られる培養物からL-ラムノースイソメラーゼ活性を有する組換えタンパク質。第1図を希少糖生産に利用する方法であって、タンパク質を作用させるその最適な生産経路を設計する。



(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,

SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

新しい触媒機能を有するL-ラムノースイソメラーゼの遺伝子配列およびその用途

5

技術分野

本発明は、Pseudomonas stutzeri の生産するL-ラムノースイソメラーゼをコードする遺伝子配列、さらにこれまで見いだされていなかった新しい糖異性化反応を触媒する触媒機能を明らかにしたものであり、該新規遺伝子配列、該新規触媒機能、ならびに、該新規触媒機能の希少糖生産および生理活性探索への利用に関する。

本発明において、利用するイズモリング (Izumoring) 連携図は、イズモリング C 6 (第 5 図、商願 2003-1630) の中のつながりと、イズモリング C 5 (第 6 図、商願 2003-1631) の中のつながりと、イズモリング C 4 の中のつながりと、C 4、C 5、C 6 が全てつながっている第 1 図で示されるイズモリング全体図であり、出願前未公開のものである。

また、L-ラムノースイソメラーゼは各種の微生物から単離され、それをコードする遺伝子の配列も報告されている。本発明は、土壌より分離したバクテリア (Pseudomonas stutzeri) のL-ラムノースイソメラーゼをコードする遺伝子配列を決定したところ、これまで報告されている遺伝子配列との相同性のないもので、遺伝子的にも、蛋白質的に新規なものであることが明らかとなったものである。

この配列を利用して遺伝子操作を利用して酵素を大量生産しそれを用いる希少糖や、その他各種遺伝子工学的手法を用いた用途に利用できるものである。

前から開始されていた。その両者がドッキングした形で、香川大学農学部で生産された希少糖（単糖）を用いて生理活性を探求する研究が、1999年から地域先導研究として開始され、さまざまな生理活性を有することが発見されてきている。

5

单糖類は還元基（カルボニル基）の状態によりアルドース（カルボニル基としてアルデヒド基を持つ糖）、ケトース（カルボニル基としてケトン基を持つ糖）、糖アルコール（別名：ポリオール、カルボニル基を持たない糖）に大別される。单糖類には「希少糖」といわれるものがある。希少糖とは、国際希少糖学会の定義によれば自然界に希にしか存在しない糖と定義されており、その種類によっては、有機化学的合成方法における収量も少ないものも多い。このため、希少糖について未知の性質のものも多く、アロースを含めたアルドヘキソース（アルドース）希少糖においても未知の性質が多いというのが現状である。

15

糖の応用研究に関し、従来、糖と癌との関係については、例えば、特許文献1に記載されているように、癌の予防に有効である多糖類が知られている。また、オリゴ糖が整腸作用を持つことを利用して便秘を解消し大腸癌などになりにくい効果をもつことや、最近ではアガリスクなどの多糖体が癌抑制効果を持つことなどの報告、糖鎖と癌転移関連の報告もある。さらに、特許文献2には、D-アロースの誘導体を有効成分とする抗腫瘍剤は開示されている。一方、糖類の活性酸素に対する性質を利用したものでは、例えば、特許文献3に記載されているように、活性酸素を抑制する性質を有する多糖類を含有させた活性酸素産生抑制剤は知られている。

さらにまた、Pseudomonas stutzeriの生産するL-ラムノースイソメラーゼがこれまで見いだされていなかった新しい糖異性化反応を触媒する触媒機能をもつことを明らかにしたものである。

L-ラムノースイソメラーゼは、希少糖D-アロースをD-フクースから
5 生産する時に有用な酵素である。本発明は遺伝子工学的な手法を用いて純粹な酵素を生産し検討した結果、これまで認めることのできなかった新しい異性化反応を触媒する能力を見いだしたもので、各種の希少糖の生産に利用できるものである。

10 背景技術

従来の未利用資源、特にバイオマス（例えば木材などの廃物）の有効利用は、それをブドウ糖へ加水分解しそれをアルコールへと変換することが大きな目標であった。しかしアルコールへ変換しても付加価値が低いため実用化は無理であった。また、多糖（未利用資源に無尽蔵に存在する）を原料として、中途半端に分解すると、オリゴ糖ができる。これも機能性のある付加価値のあるものとして用途が開発されている。

希少糖の生理活性に着目し、細胞を用いる実験によりその裏付けをすることは本発明者らによってはじめられた。21世紀は生命科学の世紀とも言われており、現在、国際的にDNA研究、タンパク質研究が進められている。ポストゲノム研究における糖と言えば糖鎖研究が中心であるが、本発明者らの属する香川医科大学（現 香川大学医学部）、香川大学農学部では、単糖に着目し、単糖に生理活性はないか等その応用研究を進めている。その背景としては、香川大学の農学部の方で希少糖の生産に関する網羅的な研究が長年積み重ねられてきて、近年になり一部25 の希少糖の大量生産技術が確立されたことが挙げられる。香川医科大学（現 香川大学医学部）においても糖に生理活性を探求する研究が数年

单糖類の中で、ブシコースは、還元基としてケトン基を持つ六炭糖である。このブシコースには光学異性体としてD体とL体とが有ることが知られている。ここで、D-ブシコースは既知物質であるが自然界に希にしか存在しないので、国際希少糖学会の定義によれば「希少糖」と定義 5 されているが、このD-ブシコースは、近年、エピメラーゼの出現（例えば、特許文献4参照）により高価ではあるが、比較的入手が容易となつた。そして、この公報に従えば、調製されたD-ブシコースは、甘味料、醸酵用炭素源、試薬、化粧品・医薬品の原料・中間体などとして有効に利用できることが示唆されている。この公報によれば、この甘味料 10 としては、飲食物、飼料、歯磨き、内服薬など経口摂取物の甘味付け嗜好性向上に利用できる旨用途の方向性が記載されているにすぎない。D-ブシコースの光学異性体であるL-ブシコースについては、可食配合物として利用可能であることが、例えば、特許文献5で詳細に開示はされている。

一方、ブシコースの試薬・医薬品等の中間原料としての応用例は、次 15 に示される。例えば、非特許文献1によれば、D-ブシコースを原料としたヒダントイン誘導体の合成例が報告されている。また、非特許文献2によれば、D-フラクトフラノシリヌクレオシドの合成例が開示されて 20 いる。いずれの先行技術にもD-ブシコースが医薬品等の原料・中間体として利用できることが報告されているにすぎない。

また、特許文献6には、構造中に六炭糖を有するコウジ酸配糖体はメラニン生成抑制作用が優れないとともに、安定性が高く、かつ水に対する溶解性が高く、美白外用剤の有効成分として適していると記載され 25 ているにすぎない。また、特許文献7には、ブシコースは皮膚バリアー機能の回復を促進して、皮膚の表皮機能の低下による表皮増殖異常等を

防止するために有用であることが記載され、保湿剤として有用性が記載されているにすぎない。また、D-タガトースを含むいくつかの糖類を有効成分とする過血糖付随疾患の予防および肥満防止用保健食が特許文献8で公開されているが、希少糖そのものの性能は記述されていない。また、特許文献9には、ケトヘキソースの一つであるD-ソルボースを含む、アラビノース、リボース、グルコースを主要構成糖とする複合多糖類について、抗高脂血症用剤としての用途が公表されているにすぎない。

しかし、「単糖」に着目し、希少糖の応用研究を進めるためにも、また、新規用途が完成された場合は一層、希少糖の大量生産技術の確立が必要となる。

一方、Pseudomonas stutzerii LL172の生産するL-ラムノースイソメラーゼは、非特許文献3で発表された以下の物理化学的性質を有する公知酵素である。

15 (イ) 作用

L-ラムノースからL-ラムニュロースへの異性化反応ならびにL-ラムニュロースからL-ラムノースへの異性化を触媒する酵素である。D-アロースとD-ブシコースの間の異性化にも作用することが既知であり（非特許文献3）、D-ブシコースからD-アロースを生産することができる酵素である。異性化酵素はもっとも高い活性を示す基質を元に命名されるため、L-ラムノースイソメラーゼと同一で命名された酵素は、大腸菌および枯草菌から単離され、それをコードする遺伝子の配列が報告されている。

(ロ) 基質特異性

L-ラムノースおよびL-ラムニュロースを基質とする。のみならず、L-リキソースおよびL-キシリロース、L-マンノースおよびL-フラクトース、D-リボースおよびD-リプロース、D-アロースおよびD

ープシコースを基質とする。

(ハ) 作用pHおよび至適pH

作用pHは7.0～10.0であり、至適pHは9.0である。

(ニ) pH安定性

5 種々のpHで4°C、1時間保持した場合、pH6.0～11.0の範囲で安定である。

(ホ) 作用温度および至適温度

作用温度は40～65°Cであり、至適温度は60°Cである。

(ヘ) 温度安定性

10 40°C、10分では安定しており、50°C、10分でも90%以上残存している。

(ト) キレート剤の影響

キレート剤であるEDTA、EGTAを活性測定時に共存させても、ほとんど活性は阻害されない。

15 (チ) 金属イオンの影響

1mMのコバルトイオンにより約30%阻害される。

(リ) SDS-PAGE法による分子量

約43,000である。

20 特許文献1 特開平5-112455号公報

特許文献2 特公昭59-40400号

特許文献3 特開平07-285871号公報

特許文献4 特開平6-125776号公報

特許文献5 特開昭57-129671号公報

25 特許文献6 特開平4-198115号公報

特許文献7 特開2000-103728号公報

特許文献 8 特開平 6-65080 号公報

特許文献 9 特開平 2-286620 号公報

非特許文献 1 Tetrahedron, 第 47 卷, No. 12/13, 第 2133 頁 (1991 年)

非特許文献 2 Acta. Chem. Scand. Ser. B. 第 38 卷, No. 5, 第 367 頁 (1984)

5 非特許文献 3 「ジャーナル・オブ・ファーメンテーション・アンド・バイオエンジニアリング (Journal of Fermentation and Bioengineering)」第 85 卷, 539 乃至 541 頁 (1998 年)

発明の開示

10 各種希少糖の生産法は、希少糖生産戦略イズモリング（第 1 図で示される生産過程と分子構造（D型、L型）により、炭素数の異なる単糖全てをつなぎだ連携図）によって生産できる設計図が、本発明者らにより完成している。その戦略の中のアルドースとケトース間を触媒するイソメラーゼは、希少アルドースおよび希少ケトースの生産に重要である。一般にアルドースイソメラーゼは基質特異性が比較的広い。すなわち、例えれば D-キシロースイソメラーゼは D-キシロースと D-キシルロース間の異性化を触媒するが、この反応のみならず、D-グルコースと D-フラクトース間の異性化をも触媒する。基質特異性が広いといつても、基質となるアルドースは 3 ~ 4 種が通常である。D-アラビノースイソメラーゼは、D-アラビノース、L-ガラクトースおよび L-フコース等に作用する等のように、構造が比較的類似したものに作用するのである。

20

そのため、第 1 図のイズモリングの種々の希少アルドース、希少ケトースの生産には、その構造を考慮した検討を行うことで目的とする希少糖を生産することが重要な検討課題となっている。

25

本発明は、第1図のイズモリング（イズモリング全体図）を希少糖生産に利用することを目的とする。

本発明は、多糖（未利用資源に無尽蔵に存在する）を原料として、ブドウ糖等単糖へ変換するところまでは従来法と同じであるが、それから
5 先が酵母によるアルコール発酵ではなく、希少糖という付加価値の高いものへの最適な生産経路を設計し、希少糖大量生産技術を確立することを目的とする。

本発明は、Pseudomonas stutzeri の生産するL-ラムノースイソメラーゼをコードする遺伝子配列を提供すること、各種遺伝子工学的手法によりこれまで見いだされていなかった新しい糖異性化反応を触媒する触媒機能を発見すること、ならびに、新規触媒機能を希少糖生産および生理活性探索へ利用することを目的とする。

本発明は、新規かつ有用なL-ラムノースイソメラーゼ遺伝子の配列を提供し、遺伝子操作、さらに明らかにした新規触媒機能を利用した希少糖の生産や各種遺伝子工学的手法、あるいは該新規触媒機能を用いた用途に利用できるようにすることを目的とする。

本発明は、Pseudomonas stutzeri の生産するL-ラムノースイソメラーゼをコードする遺伝子配列を、さらに明らかにした新規触媒機能を、イズモリング全体図を用いて、希少糖生産に利用すること、さらに、希少糖の生理活性探索に寄与することを目的とする。

さらに、本発明は、イズモリング（第1図）の希少糖戦略の中で、多種類の希少アルドースに作用し、多種類の希少ケトースを生産するために最も効率のよいイソメラーゼを得ることによって、多種類の希少糖を生産する反応系を確立することを目的とする。

ゼをコードする遺伝子配列を明らかにしたものである。L-ラムノースイソメラーゼは各種の微生物から単離され、それをコードする遺伝子の配列も報告されている。しかし、これらの起源由来のL-ラムノースイソメラーゼがD-ブシコースに反応してD-アロースを作るという報告はない。

5 本発明は、土壤より分離したバクテリア (Pseudomonas stutzerii LL1 72) のL-ラムノースイソメラーゼをコードする遺伝子配列を決定したところ、これまで報告されている遺伝子配列との相同性のないもので、遺伝子的にも、蛋白質的に新規なものであることが明らかとなったものである。この配列を利用することで、遺伝子操作を利用して酵素を大量生
10 産しそれを用いる希少糖や、その他各種遺伝子工学的手法を用いた用途に利用できるものである。

L-ラムノースからL-ラムニュロースへの異性化反応ならびにL-ラムニユロースからL-ラムノースへの異性化反応を触媒するPseudomonas stutzerii 由来のL-ラムノースイソメラーゼをコードするDNAと、該DNAを用
15 いる組換えDNA技術によるポリペプチドの製造方法を提供することにより解決する。

さらに、本発明者らは研究をすすめ、Pseudomonas stutzeriの生産するL-ラムノースイソメラーゼがこれまで見いだされていなかった新しい糖異性化反応を触媒する触媒機能をもつことを明らかにした。本発明においては、イズモリング（第1図）の中の、異性化反応を触媒する酵素をL-ラムノースイソメラーゼのもつ新たに発見された触媒能力を利用して各種希少糖を生産するものである。

これまで個別の異性化反応を、個別の異なるイソメラーゼを用いて反応していたものを、L-ラムノースイソメラーゼの非常に広い基質特異性を利用してことで、一つの酵素を用いて、多種類の希少糖を生産しよ

うとするものである。

すなわち、本発明は、L-ラムノースイソメラーゼが多くの異性化反応を触媒することにより、これまで不可能であった希少糖の生産を一つの酵素を有効に利用して効率的に各種の希少糖の生産が可能になった。

5

すなわち、本発明は、以下のDNAを要旨とする。

(1) 以下の(a)または(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつL-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質

(2)配列番号1に示される塩基配列若しくはその相補的配列またはこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなるDNA。

(3)上記(2)のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、L-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(4) Pseudomonas stutzerii 由来のL-ラムノースイソメラーゼである上記(1)、(2)または(3)のDNA。

(5)上記のL-ラムノースイソメラーゼは、以下の物理化学的性質を有する酵素である上記(4)のDNA。

(イ) 作用

第7図、第8図、第9図に太い黒線で示される異性化反応を触媒する。

(ロ) 作用pHおよび至適pH

作用pHは7.0～10.0であり、至適pHは9.0である。

25 (ハ) pH安定性

種々のpHで4°C、1時間保持した場合、pH 6.0～11.0の範

囲で安定である。

(ニ) 作用温度および至適温度

作用温度は40～65°Cであり、至適温度は60°Cである。

(ホ) 温度安定性

5 40°C、10分では安定しており、50°C、10分でも90%以上残存している。

(ヘ) キレート剤の影響

キレート剤であるEDTA、EGTAを活性測定時に共存させても、ほとんど活性は阻害されない。

10 (ト) 金属イオンの影響

1mMのコバルトイオンにより約30%阻害される。

(チ) SDS-PAGE法による分子量

約43,000である。

15 また、本発明は、以下のタンパク質を要旨とする。

(6) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(7) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつL-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質。

20 (8) L-ラムノースイソメラーゼ活性は、以下の物理化学的性質によって特定されるものである上記(6)または(7)のタンパク質。

(イ) 作用

第7図、第8図、第9図に太い黒線で示される異性化反応を触媒する。

(ロ) 作用pHおよび至適pH

25 作用pHは7.0～10.0であり、至適pHは9.0である。

(ハ) pH安定性

種々の pH で 4 °C、1 時間保持した場合、pH 6.0 ~ 11.0 の範囲で安定である。

(ニ) 作用温度および至適温度

作用温度は 40 ~ 65 °C であり、至適温度は 60 °C である。

5 (ホ) 温度安定性

40 °C、10 分では安定しており、50 °C、10 分でも 90 % 以上残存している。

(ヘ) キレート剤の影響

キレート剤である EDTA、EGTA を活性測定時に共存させても、

10 ほとんど活性は阻害されない。

(ト) 金属イオンの影響

1 mM のコバルトイオンにより約 30 % 阻害される。

(チ) SDS-PAGE 法による分子量

約 43,000 である。

15 (9) 上記(6)、(7)または(8)のタンパク質と、翻訳開始コドンタンパク質とを結合させた融合タンパク質。

また、本発明は、下記の(10)の組換えベクターを要旨とする。

(10) 上記(1)ないし(5)のいずれか記載の DNA を含む組換えベクター。

20 また、本発明は、下記の(11)の宿主細胞を要旨とする。

(11) 上記(6)、(7)または(8)のタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞。

また、本発明は、下記の(12)の組換えタンパク質の製造方法を要旨とする。

(12) 上記(11)の宿主細胞を培地に培養し、得られる培養物から L-ラ

ムノースイソメラーゼ活性を有する組換えタンパク質を採取することを特徴とする組換えタンパク質の製造方法。

さらにまた、本発明は、下記の(13)のイズモリング (Izumoring) 連5 携図を希少糖生産に利用する方法を要旨とする。

(13) 第1図で示される生産過程と分子構造 (D型、L型) により、炭素数の異なる単糖全てをつなぎ連携図を希少糖生産に利用する方法であって、目的とする希少糖の、単糖の全体像中の位置を把握し、上記(6)、(7)、(8)または(9)のタンパク質を作用させるその最適な生産10 経路を設計することを特徴とする方法。

(14) 希少糖生産が希少糖大量生産である上記(13)の方法。

(15) 希少糖生産が未利用資源からの希少糖生産である上記(13)または(14)の方法。

(16) 目的とする希少糖が、生理活性が判明した希少糖である上記(115 3)、(14)または(15)の方法。

発明の効果

L-ラムノースイソメラーゼを遺伝子工学的手法によって、大量に生産することが可能となり、本酵素を用いたD-アロースを含む各種の希少糖20 の大量生産法を確立できる。

本発明は、最も安価に大量に入手できる原料はD-グルコース (ブドウ糖) である。このD-グルコースはほとんどすべての未利用植物に大量に存在する糖であり、これを有効に利用して目的とする希少糖への最適な生産経路を設計するツールを提供することができる。

25 また、本発明は、希少糖の生産分野ばかりではなく、希少糖の持つ生理活性を探索する研究においても有効なツールを提供することができる。

図面の簡単な説明

第1図は、イズモリング (Izumoring) 連携図である。

5 第2図は、本発明のPseudomonas stutzerii LL172 由来のL-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子 (DNA) の塩基配列とアミノ酸配列を示す図面である。

10 第3図は、本発明のPseudomonas stutzerii LL172 菌由来のL-ラムノースイソメラーゼと公知のBacillus subtilis 由来のL-ラムノースイソメラーゼのアミノ酸配列を比較する図面である。

15 第4図は、本発明のPseudomonas stutzerii LL172 菌由来のL-ラムノースイソメラーゼと公知のStreptomyces coelicolorまたはThermotoga maritima由来の未同定の推定イソメラーゼの相同性を説明する図面である。

第5図は、第1図の下段のイズモリング C 6 の説明図である。

20 第6図は、第1図の中段のイズモリング C 5 の説明図である。

第7図は、イズモリングを用いて示した、L-ラムノースイソメラーゼが触媒するヘキソースの異性化反応である。太い黒線が触媒することが確認された異性化反応である。太い点線が触媒反応が確認されなかった異性化反応である。

25 第8図は、イズモリングを用いて示した、L-ラムノースイソメラーゼが触媒するペントースの異性化反応である。太い黒線が触媒することが確認された異性化反応である。全ての異性化反応が確認された。

第9図は、イズモリングを用いて示した、L-ラムノースイソメラーゼが触媒するヘテトロースの異性化反応である。太い黒線が触媒することが確認された異性化反応である。全ての異性化反応が確認された。

第10図は、従来の単糖類のまとめ方の一例を示す図面である。

発明を実施するための最良の形態

Pseudomonas stutzerii に属する菌株「Pseudomonas stutzerii LL17

5 2」は、上記文献に記載された公知菌であり、香川大学農学部生物資源
食糧化学科 何森健研究室に保存されている。このたび国際出願をする
に際し、本菌株を日本国独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄
託センター（日本国茨城県つくば市東1-1-1 中央第6）に200
10 4年1月6日に国際寄託している（IPOD FERM BP-08593）。なお、本菌
株はLL172aとも表示することがあるが、LL172とLL172aは同一菌株であ
る。

L-ラムノースイソメラーゼは、L-ラムノースからL-ラムニュロースへ
の異性化反応ならびにL-ラムニュロースからL-ラムノースへの異性化を
15 触媒する酵素である。Pseudomonas stutzerii LL172の生産するL-ラムノ
ースイソメラーゼは、D-アロースとD-プシコースの間の異性化にも作用
するので、D-プシコースからD-アロースを生産することができる酵素で
ある。ただし、D-プシコースからD-アロースを生産するためには、Pseu
domonas stutzerii LL172由来の酵素が必要である。

20 Pseudomonas stutzerii LL172由来のL-ラムノースイソメラーゼをコードする遺伝子配列は、これまで報告されているL-ラムノースイソメラーゼの遺伝子配列との相同性のないもので、遺伝子的にも、蛋白質的に新規なものであることが明らかとなったものである。

25 本発明でいうL-ラムノースイソメラーゼは、Pseudomonas stutzerii LL172由来のL-ラムノースイソメラーゼであって、配列番号1に記載され

るアミノ酸配列、またはそのアミノ酸配列の中の1個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換され、欠失され、1個以上のアミノ酸が付加されてなるアミノ酸配列を有する。本発明でいう遺伝子（DNA）は、上記のL-ラムノースイソメラーゼをコードする塩基配列を有する。

5

すなわち、本発明の対象となるタンパク質としては、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（L-ラムノースイソメラーゼ）や、該配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ10 L-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質を挙げができる。

また、上記L-ラムノースイソメラーゼ活性としては、好ましくはL-ラムノースからL-ラムニュロースへの異性化反応ならびにL-ラムニュロースからL-ラムノースへの異性化を触媒する酵素活性を挙げができる。また、D-アロースとD-ブシコースの間の異性化を触媒する酵素活性を挙げができる。D-アロースをD-ブシコースから生産できる活性は、Pseudomonas stutzerii LL172由来のL-ラムノースイソメラーゼ以外には報告されていない。

さらに、Pseudomonas stutzerii LL172の生産するL-ラムノースイソメラーゼは、以下の物理化学的性質を有する酵素であること明らかにした。

（イ）作用

L-ラムノースからL-ラムニュロースへの異性化反応ならびにL-ラムニュロースからL-ラムノースへの異性化を触媒する。D-アロースとD-ブシコースの間の異性化にも作用し、D-ブシコースからD-アロースを生産することができる酵素である。以上が既知の主たる作用である。さらに本発明者らによりこの度明らかとなったL-ラムノースイソメラーゼの新

規触媒反応を含めた全ての異性化反応は、イズモリングの第7図、第8図、第9図に示される。基質特異性は表1、2、3参照。

L-ラムノースおよびL-ラムニュロースを基質とする。のみならず、L-リキソースおよびL-キシリロース、L-マンノースおよびL-フラクトース、D-リボースおよびD-リブロース、D-アロースおよびD-オプシコースを基質とする。以上が既知の主たる基質特異性である。第7図、第8図、第9図よりL-ラムノースイソメラーゼが単糖の多くを基質とすることが理解できる。

すなわち、活性の大小はあるものの、L-ラムノースイソメラーゼが触媒することが確認された異性化反応は第7図中太い黒線で示したものである。一方、異性化反応が確認できなかったものは、太い点線で示した4種であることが一目瞭然に理解できる。

また、第9図、第10図に示すように、これも活性の大小はあるものの、ペントースおよびテトロースにおける全異性化活性を持つことを示している。

(ハ) 作用pHおよび至適pH

作用pHは7.0～10.0であり、至適pHは9.0である。

(ニ) pH安定性

種々のpHで4°C、1時間保持した場合、pH 6.0～11.0の範囲で安定である。

(ホ) 作用温度および至適温度

作用温度は40～65°Cであり、至適温度は60°Cである。

(ヘ) 温度安定性

40°C、10分では安定しており、50°C、10分でも90%以上残存している。

(ト) キレート剤の影響

キレート剤であるEDTA、EGTAを活性測定時に共存させても、ほとんど活性は阻害されない。

(チ) 金属イオンの影響

1 mMのコバルトイオンにより約30%阻害される。

5 (リ) SDS-PAGE法による分子量

約43,000である。

本発明の対象となるDNAとしては、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質や、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、
10 1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつL-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAや、配列番号1に示される塩基配列またはその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNAや、かかるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつL-ラムノースイソメラ
15 ーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを好ましいものとして例示することができる。

これらDNAは、そのDNA配列情報等に基づき、遺伝子ライブラリーなどから公知の方法により調製することができる。また、配列番号1に示される塩基配列またはその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部をプローブとして、各種細胞由来のDNAライブラリーに対してストリンジエントな条件下でハイブリダイゼーションを行ない、該プローブにハイブリダイズするDNAを単離することにより、L-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを得ることもできる。かかるDNAを取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42°Cでのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含

む緩衝液による42°Cでの洗浄処理を挙げることができ、65°Cでのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC, 0.1%のSDSを含む緩衝液による65°Cでの洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、種々の要素を適宜組み合わせて、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジエンシーと同等のストリンジエンシーを実現することが可能である。

本発明の融合タンパク質としては、上記本発明のタンパク質と翻訳コドンタンパク質とが結合しているものであればどのようなものでもよく、翻訳コドンタンパク質としては、従来知られている翻訳コドンタンパク質であれば特に制限されるものではない。かかる融合タンパク質は、常法により作製することができ、当該分野の研究用試薬としても有用である。

15

本発明はまた、上記本発明のタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞に関する。かかる本発明のタンパク質をコードする遺伝子の宿主細胞への導入は、Davisら (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986) 及びSambrookら (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法により行うことができる。そして、宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞等を挙げることができる。

25

また、発現系としては、上記本発明のタンパク質を宿主細胞内で発現

させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。この発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

10

上記発現系を含んでなる宿主細胞を培養して得られる本発明のタンパク質は、D-アロースの生産に用いることができる。また、かかる本発明のタンパク質を細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが用いられる。

20

希少糖とは、自然界に希にしか存在しない单糖（アルドース、ケトースおよび糖アルコール）と定義づけることができるが、この定義は糖の構造や性質による定義ではないため、あいまいである。すなわち、一定量以下の存在量を希少糖というなどの量の定義はなされていないためである。しかし、一般に自然界に多量に存在するアルドースとしてはD-グルコース、D-ガラクトース、D-マンノース、D-リボース、D-キシロース、

L-アラビノースの6種類あり、それ以外のアルドースは希少糖と定義される。ケトースとしては、D-フラクトースが存在しており、他のケトースは希少糖といえる。また糖アルコールは単糖を還元してできるが、自然界にはD-ソルビトールが比較的多いがそれ以外のものは量的には少ないので、これらも希少糖といえる。

希少糖は、これまで入手 자체が困難であったが、自然界に多量に存在する単糖から希少糖を生産する方法が開発されつつあり、その技術を利用して製造することができる。

10 以下、イズモリング (Izumoring) 連携図について説明する。

第1図で示される生産過程と分子構造 (D型、L型) により、炭素数4から6の単糖全てをつなぎ連携図がイズモリング (Izumoring) の全体図である。すなわち、第1図から理解できることは、単糖は、炭素数4、5、6全てがつながっているということである。全体図は、イズモリング C 6 の中のつながりと、イズモリング C 5 の中のつながりと、イズモリング C 4 の中のつながりと、C 4、C 5、C 6 が全てつながっていることである。この考え方は重要である。炭素数を減少させるには主に発酵法を用いる。炭素数の異なる単糖全てをつなぐという大きな連携図であることも特徴である。また、利用価値がないということも理解することができる。

炭素数が6つの単糖 (ヘキソース) のイズモリングは、第1図の下段および第5図に示すように、炭素数が6つの単糖 (ヘキソース) は全部で34種類あり、アルドースが16種類、ケトースが8種類、糖アルコールが10種類ある。これらの糖は、酸化還元酵素の反応、アルドース異性化酵素の反応、アルドース還元酵素の反応で変換できることは、本

発明者らの研究を含めた研究で知られている。しかしながら、これまでの研究では上のグループ、真ん中のグループ、下のグループは酵素反応でつながっていなかった。つまり、上のグループに属しているD-グルコース（ブドウ糖）やD-フランクトースは自然界に多量に存在する糖であり安価であるが、これらから希少糖を合成することができなかつた。ところが、本発明者らの研究の過程で、これを結ぶ酵素が発見された。それはガラクチトールからD-タガトースを合成する酵素を持つ菌の培養液中に、全く予期しなかつたD-ソルボースが発見されたことに端を発する。その原因を調べた結果、この菌がD-タガトース3エピメラーゼ（DTE）という酵素を产生していることを発見した。第1図の下段および第6図に示すように、このDTEはこれまで切れていたD-タガトースとD-ソルボースの間をつなぐ酵素であることがわかる。

そしてさらに驚くことに、このDTEは全てのケトースの3位をエピ化する酵素であり、これまで合成接続できなかつたD-フランクトースとD-ブシコース、L-ソルボースとL-タガトース、D-タガトースとD-ソルボース、L-ブシコースとL-フランクトース、に作用するという非常に幅広い基質特異性を有するユニークな酵素であることが分かつた。このDTEの発見によって、すべての単糖がリング状につながり、単糖の知識の構造化が完成し、イズモリング（Izumoring）と名付けた。

この第5図をよく見てみると、左側にL型、右側にD型、真ん中にDL型があり、しかもリングの中央（星印）を中心としてL型とD型が点対称になっていることもわかる。例えば、D-グルコースとL-グルコースは、中央の点を基準として点対称になっている。しかもイズモリング（Izumoring）の価値は、全ての単糖の生産の設計図にもなつてゐることである。先の例で、D-グルコースを出発点としてL-グルコースを生産しようと思えば、D-グルコースを異性化→エピ化→還元→酸化

→エピ化→異性化するとL-グルコースが作れることを示している。

炭素数が6つの单糖(ヘキソース)のイズモリング(Izumoring)を使って、自然界に多量に存在する糖と微量にしか存在しない希少糖との関係が示されている。D-グルコース、D-フラクトース、D-マンノースと、牛乳中の乳糖から生産できるD-ガラクトースは、自然界に多く存在し、それ以外のものは微量にしか存在しない希少糖と分類される。DTEの発見によって、D-グルコースからD-フラクトース、D-ブシコースを製造し、さらにD-アロース、アリトール、D-タリトールを製造することができるようになった。

炭素数が6つの单糖(ヘキソース)のイズモリング(Izumoring)の意義をまとめると、生産過程と分子構造(D型、L型)により、すべての单糖が構造的に整理され(知識の構造化)、单糖の全体像が把握できること、研究の効果的、効率的なアプローチが選択できること、最適な生産経路が設計できること、欠落部分について予見できること、が挙げられる。

炭素数が5つの单糖(ペントース)のイズモリングは、第1図の中段および第6図に示すように、炭素数6のイズモリングよりも小さいリングである。しかし、C6のイズモリングと同じようにアルドース8個、ケトース4個および糖アルコール4個全てを含むことに変わりは無く、全てが酵素反応で結ばれる。異なる点は、酸化還元反応、異性化反応のみでリング状に全てが連結できることである。一方、DTEを用いることによって、さらに効率のよい生産経路が設計できることがわかる。

炭素数5のイズモリングの特徴は、特に第6図から明らかにように、炭素数6のイズモリングが点対象に全单糖が配置されているのに対し、左右が対象に配置されていることが大きな特徴である。これら全ペント

ースは、酵素反応により連結されていることから、炭素数 6 のイズモリングの場合と全く同様に、すべてのペントースが構造的に整理され（知識の構造化）、全体像が把握できること、研究の効果的、効率的なアプローチが選択できること、最適な生産経路が設計できること、欠落部分 5 について予見できる意義を持っている。

炭素数が 4 つの単糖（テトロース）のイズモリングは、第 1 図の上段に示すように、テトロースの構造上の特性のため、リングが完成しない 10 という特徴がある。炭素数 5 のイズモリング上部半分の構造を持っている。このリングの場合も、炭素数 5, 6 の場合と同様の酸化還元および異性化反応によって連結されている。D T E が炭素数 4 のケトースに反応しないため、ケトース間の反応は現在のところ存在しない。しかし、新規のエピメラーゼの存在が予測され、この研究は現在研究途上である。

全体の配置は、炭素数 5 と同様に左右対称であり、アルドース 4 個、 15 ケトース 2 個および糖アルコール 3 個全てを含んでいる。すなわち炭素数 5, 6 のイズモリングと同様の意義が存在する。

イズモリング C 6 の D-グルコースは、イズモリング C 5 の D-アラビトールおよびイズモリング C 4 のエリスリトールとつながっている。 20 この線は、発酵法によって D-グルコースから D-アラビトールおよびエリスリトールを生産できることを示している。すなわち、イズモリング C 6, イズモリング C 5 およびイズモリング C 4 は連結されている。この連結は、炭素数の減少という主に発酵法による反応であり、この D-アラビトールおよびエリスリトールへの転換反応の二つ以外の発酵法 25 によるイズモリング C 6 とイズモリング C 5, C 4 との連結は可能である。例えば D-グルコースから D-リボースの生産も可能である。

このように、3つのイズモリングにより全ての炭素数4, 5, 6の単糖（アルドース、ケトース、糖アルコール）が連結されたことで、それぞれの単糖が全単糖の中でその存在場所を明確に確認できる。

5 最も有名なキシリトールは、未利用資源の木質から生産できるD-キシロースを還元することで容易に生産できることを明確に確認できる。

もしも特定の単糖が生物反応によって多量に得られた場合には、それを原料とした新たな単糖への変換の可能性が容易に見いだすことが可能
10 である。すなわち、この全体像から全ての単糖の原料としての位置を確
実につかむことができるため、有用な利用法を設計することができる。
特に廃棄物や副産物から単糖が得られた場合の利用方法を容易に推定で
きるのである。

15 本発明は、イズモリング（第1図）の希少糖戦略の中で、上記のとおり、多種類の希少アルドースに作用し、多種類の希少ケトースを生産するため最も効率のよいイソメラーゼを得ることができ、それによって多種類の希少糖を生産する反応を確立することが可能となった。すなわち、さらに明らかとなった新規触媒機能を、イズモリング全体図を用いて、希少糖生産に利用すること、さらに、希少糖の生理活性探索に寄与
20 することが可能となった。

イズモリングの第7図、第8図、第9図から明らかなように、イズモリングを用いて異性化反応を整理することが全体を理解する手段として如何に有効であるかを示している。さらに、L-ラムノースイソメラーゼが単糖の多くを基質とすることが理解できる。

すなわち、活性の大小はあるものの、L-ラムノースイソメラーゼが

触媒することが確認された異性化反応は第7図中太い線で示したものである。一方、異性化反応が確認できなかったものは、太い点線で示した4種であることが一目瞭然に理解できる。

また、第8図、第9図に示すように、これも活性の大小はあるものの、
5 ペントースおよびテトロースにおける全異性化活性を持つことを示している。

このようにイズモリングを利用することで、L-ラムノースイソメラーゼの触媒する反応を明確に示すことができると同時に、反応が確認できないものを明確に認識することが可能である。

10 新しく確認された各種の異性化活性はアルドースからの反応と、ケトースからの反応の結果が若干異なるなど詳細な反応機構を検討すること必要があるが、第7図、第8図、第9図が示すように非常に多くの希少糖の生産に利用できる可能性を持つことが明らかとなった。

15 本願発明の詳細を実施例で説明する。本願発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例 1

L-ラムノースを大量に生産する方法の一つとして、遺伝子工学的手法での増産が考えられる。そこで従来の方法で本酵素をコードする遺伝子
20 をクローン化し遺伝子配列およびアミノ酸配列を決定した。その結果が以下のとおりであった。

【配列決定】

Pseudomonas stutzerii LL172 由来L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子
は、配列表1および第2図に示すとおり、ORF1, 290-bpからなり430アミ
25 ノ酸をコードする新規のL-ラムノースイソメラーゼ遺伝子である。配列
表2のアミノ酸配列からの計算分子量は46,946とオーセンティックの酵

素の分子量約43,000よりやや大きいものであった。

本遺伝子を大腸菌で組換え発現させると本酵素を活性発現し分子量も約43,000と一致した。

5 大腸菌に入れた実験の場合の酵素発現の結果は以下のとおりである。

従って配列表1および第2図に示した遺伝子配列は、L-ラムノースイソメラーゼのものであると確認された。

[本遺伝子配列の特徴]

L-ラムノースイソメラーゼの遺伝子はすでに大腸菌と枯草菌で構造が
10 解析されているが、Pseudomonas stutzerii LL172 菌由来のL-ラムノースイソメラーゼとのアミノ酸配列の相同性は第3図に示すとおり20%以下と低く、触媒部位も一致しないので同一の酵素ではないと断定した。

すなわちこれまで発表されているL-ラムノースイソメラーゼとは全く新しい遺伝子配列をもつ酵素であった。

15 アミノ酸配列の相同性をデータベースで用いて解析すると、第4図に示すとおり、未同定の推定イソメラーゼと40%程度の高い相同性を示すが、これらの菌の遺伝子はゲノムプロジェクトによりシークエンスされた結果であり、酵素としては同定されていない。

以上の結果から、本菌由来のL-ラムノースイソメラーゼ遺伝子は、新規の酵素をコードする遺伝子であると断定することができた。

[用途]

遺伝子配列が明確になったことで、この遺伝子配列を利用した分子生物学的手法による各種の実験が可能となる。

25 例えは、この遺伝子を大腸菌に形質転換し、大量に生産することが可能である。その他この遺伝子にさらに何か新たな遺伝子を結合させるな

として、新しい性質を持つ酵素を生産することが可能となる。

実施例 2

<L-ラムノースイソメラーゼをコードするDNA>

5 1 L-ラムノースイソメラーゼの精製と部分アミノ酸配列の決定

Pseudomonas stutzerii LL172 をトリプティックソイプロス培地で 3 0 °C 2 日間培養しポリエチレングリコール分画、陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製後電気泳動で分子量と純度を確認する。分子量は約 42,000 に単一のバンドとして得られる。臭化シアンを用いて酵素を部分 10 分解し N 末端および 4箇所の部分アミノ酸配列を決定した。

2 プローブの合成と染色体マッピング

上記の培地で培養後、定法に従い CTAB を用いて染色体 DNA を抽出する。部分アミノ酸配列を元にミックスプライマーを合成し組み合わせを変え 15 て 2 回の PCR により特異的に増幅される PCR 産物を得てプローブに用いる。プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行い L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子の染色体上の位置を決定した。

3 ゲノムライプラリーのスクリーニング

20 染色体マッピングにより制限酵素 *Apa*I と *Sac*I で消化した約 4.6 kb の断片に遺伝子が含まれていることが分かったのでクローニングベクター pBluescript II SK+ に連結しゲノムライプラリーを構築してプローブを用いてスクリーニングした。

25 4 L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子の解析

L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子は配列表 1 および第 2 図に示すとお

り ORF 1,290-bp からなり 430 アミノ酸 (配列表 2) をコードする新規の L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子である。アミノ酸配列からの計算分子量は 46,946 と C 末端側に修飾を受ける元菌の酵素の分子量約 42,000 よりやや大きい。L-ラムノースイソメラーゼの遺伝子はすでに大腸菌と枯草 5 菌で構造が解析されているが、本菌由来の L-ラムノースイソメラーゼとのアミノ酸配列の相同性は第 3 図に示すとおり 20% 以下と低く、触媒部位も一致しないので同一の酵素ではないと断定した。また、大腸菌の L-ラムノースイソメラーゼと放線菌のキシロースイソメラーゼで保存されている異性化酵素のコンセンサスアミノ酸残基 9 箇所のうち 5 箇所は保存されているが Mn 結合や基質結合部位は保存されていない。アミノ酸配列の相同性をデータベースで用いて解析すると第 4 図に示すとおり未同定の推定イソメラーゼと 40% 程度の高い相同性を示すが、これらの菌の遺伝子はゲノムプロジェクトによりシークエンスされた結果であり、酵素としては同定されていない。

15 以上の結果から本菌由来の L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子は新規の酵素をコードする遺伝子であると断定した。

5 組換え L-ラムノースイソメラーゼの活性発現

L-ラムノースイソメラーゼの翻訳開始コドンと高発現ベクター pQE60 20 の翻訳開始コドンを一致させるようプライマーを設計し PCR で增幅させた L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子を pQE60 に組み込んで大腸菌 JM109 を形質転換し組換え大腸菌を作成した。組換え大腸菌は通常培地で 37°C 一晩培養すると L-ラムノースイソメラーゼを活性発現し N 末端アミノ酸配列、分子量、および、酵素学的諸性質は元菌由来の酵素と一致、酵素生 25 産量は 10 倍以上上昇し高発現が可能となった。

実施例 3

D-グルコースから希少糖であるD-リキソースの生産を行った。酵母Candida famata R28を用いてD-グルコースから50%の収率でD-アラビトールを生産した。この反応は発酵法で行った。生産したD-アラビトールを酢酸菌Acetobacter aceti IFO 3281によってほぼ100%の収率でD-キシロースへ変換した。これをL-リボースイソメラーゼを用いて、D-リキソースへと異性化することができた。生産物はイオン交換クロマトグラフィー等により精製結晶化し、D-リキソースであることを機器分析によって確認した。

すなわち、D-グルコースを原料として発酵法により、炭素数の一つ少ないD-リキソールへ変換し、酸化反応、異性化反応によって希少糖D-リキソースを生産することが可能である。 (Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 88, 676, 1999)

実施例 4

D-グルコースを原料として発酵法で作られるエリスリトールから希少糖L-エリスロースの生産を行った。エリスリトールをGluconobacter frateurii IF0 3254を用いてL-エリスルロースに酸化した。この反応はほぼ100%の収率で得られた。反応液からL-エリスルロースを分離し、これを原料としてL-リボースイソメラーゼを作用させることで、希少糖L-エリスロースを生産できた。10gのエリスリトールから1.7gのL-エリスロースを生産することができた。 (Journal of Bioscience and Bioengineering Vol. 92, 237, 2001)

すなわち、D-グルコースを出発物質として、炭素数の2少ないエリスリトールを発酵法で生産し、それを原料として用いることで、酸化反応と異性化反応によって希少糖L-エリスロースを生産することができる。

である。

実施例 5

実施例 2 の Pseudomonas stutzerii LL172 由来の L-ラムノースイソメラーゼをコードする遺伝子に C 末端に 6 個の H i s を連結するように設計し、それを大腸菌に形質転換した。この H i s を連結した L-ラムノースイソメラーゼを大量に発現させ、ニッケル N T A カラムを用いた親和力クロマトグラフィー法によって、純粋な酵素を大量に生産しそれぞれ固定化して用いることで新しい機能を発揮させることが可能となった。表 1 にはアルドース、表 2 にはケトースを基質として実験を行い、それらの反応時間後の反応液中の糖組成を H P L C によって分析した実験結果を整理して示した。すなわち、表 1 は L-ラムノースイソメラーゼの反応を基質として各種アルドースを用いて行った時の、反応後の生産物組成を示している。表 2 は L-ラムノースイソメラーゼの反応を基質として各種ケトースを用いて行った時の、反応後の生産物組成を示している。

表 1

*P. stutzeri*由来のL-ラムノース イソメラーゼによる各種アルドースの転換比率

基質 (20mg/ml)	生産物 ^a		転換 比率 ^b (%)	時間 ^c (h)
	ケトース	アルドース		
5	L- ラムノース	L- ラムニュロース	nd	55 : 45 1
	D- グルコース	D- フラクトース	D- マンノース	51 : 44 : 5 12
	L- グルコース	L- フラクトース	L- マンノース	71 : 21 : 5 96
	L- マンノース	L- フラクトース	L- グルコース	26 : 62 : 12 96
	D- マンノース	D- フラクトース	D- グルコース	90 : 4 : 6 96
	D- ガラクトース	D- タガトース	nd	92 : 8 144
	L- ガラクトース	L- タガトース	L- タロース	50 : 48 : 2 24
	D- グロース	D- ソルボース	nd	10 : 90 : 8
10	D- アルトロース	D- プシコース	D- アロース	8 : 70 : 22 24
	D- キシロース	D- キシルロース	D- リキソース	58 : 40 : 2 48
	L- キシロース	L- キシルロース	L- リキソース	61 : 35 : 4 48
	D- リキソース	D- キシルロース	D- キシロース	40 : 4 : 56 48
	L- リキソース	L- キシルロース	L- キシロース	50 : 3 : 37 48
	D- アラビノース	D- リブロース	D- リボース	74 : 10 : 16 72
	L- アラビノース	L- リブロース	nd	94 : 4 72
	D- リボース	D- リブロース	D- アラビノース	16 : 14 : 70 96
15	L- リボース	L- リブロース	L- アラビノース	45 : 47 : 8 96
	D- エリスロース	D- エリスルロース	D- スレオース	12 : 78 : 10 8
	L- エリスロース	L- エリスルロース	L- スレオース	69 : 25 : 6 8
	D- スレオース	D- エリスルロース	D- エリスロース	26 : 61 : 13 8
20	L- スレオース	L- エリスルロース	L- エリスロース	33 : 63 : 4 8

a 全てのケースにおいて、ケトースがはじめに生産された。

b 比率は 基質:ケトース:アルドース

c 最も高い転換比率が得られた時の時間を表している。

nd 検出されなかった。

表 2

*P. stutzeri*由来のL-ラムノース イソメラーゼによる各種ケトースの転換比率

基質 (20mg/ml)	生産物		転換 比率 ^b (%)	時間 ^c (h)
	アルドース I ^a	アルドース II		
5	D- フラクトース	D- マンノース	D- グルコース	46 : 4 : 50 12
	L- フラクトース	L- マンノース	L- グルコース	75 : 14 : 11 96
	L- タガトース	L- ガラクトース	L- タロース	48 : 45 : 7 72
	D- タガトース	D- ガラクトース	nd	89 : 11 96
	L- ソルボース	L- グロース	nd	94 : 6 96
	D- ソルボース	D- グロース	nd	90 : 10 96
	D- プシコース	D- アロース	D- アルトロース	70 : 22 : 8 96
	L- プシコース	nd	L- アルトロース	94 : 6 96

10

a 全てのケースにおいて、初期に観察されたアルドース。

b 比率は、基質:アルドース:アルドース

c 最も高い転換比率が得られた時の時間を表している。

nd 検出されなかった。

実施例 6

15

《酵素の各基質に対するK_mおよびV_{m a x}》

実施例 5 と同様の条件で酵素を得た。K_mおよびV_{m a x}の測定には酵素を固定化することなく用いて測定を行った。その結果を表 3 に整理して示した。すなわち、表 3 は、精製したL-ラムノースイソメラーゼの各種基質に対するK_mおよびV_{m a x}を測定した結果である。

20

表 3

*P.stutzeri*由来のL-ラムノース イソメラーゼの各種アルドースに対するKmとVmax

基 質	Km (mM)	Vmax (U/mg)
L- ラムノース	11.9	238
L- マンノース	55.5	138.9
D- リボース	38.5	21.4
L- リキソース	61.7	123.4
D- キシロース	250	1.1
D- グルコース	564	0.01
D- アロース	42	6.76
D- アルトロース	71	0.01
D- アラビノース	127.4	0.067
L- アラビノース	2.35	0.061
L- キシロース	203	0.0065

実施例 7

《実施例 5 および 6 で使用した微生物の詳細な説明》

C末端にヒスタグを連結したL-ラムノースイソメラーゼ遺伝子を導入した大腸菌 JM109 を用いた。

《培地組成および培養条件》

ポリペプトン 3.5%、酵母エキス 2.0%、NaCl 1.0% (pH 7.0) の培地に大腸菌 JM109 を接種し、28°C 12 時間培養後終濃度 1 mM の IPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド) を添加した。その後 4 時間培養を続け、遠心分離により菌体を集菌した。

《酵素の抽出、酵素の精製および酵素の精製と固定化》

菌体を 0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.0 で 2 回洗浄した。洗浄菌体をアルミナ粉末とともに磨碎したのち遠心分離を行い、不溶性

物質をアルミナ粉末とともに除去し粗酵素液をえた。その粗酵素液を N
i - N T A カラムを用いてアフィニティークロマト法によって酵素を精
製し純粋な酵素を得た。酵素を超純水に対して透析した後、凍結乾燥し
て粉末の純粋な酵素を得た。その酵素 20 mg をキトバール樹脂 1 g に
5 吸着させることで固定化酵素を調製した。

《各種基質を用いた酵素反応条件》

上記固定化酵素 3 g、0.05 M グリシン NaOH 緩衝液 (pH 9.
0) 3.0 mL、1 M MnCl₂ 3.0 μ L および各種基質 60 mg
10 (終濃度 20 mg/mL) の酵素反応液組成で、42°C で反応を行った。

産業上の利用可能性

1. L-ラムノースイソメラーゼを遺伝子工学的手法によって、大量に
15 生産することが可能となり、本酵素を用いたD-アロースを含む各種の希
少糖の大量生産法を確立できる。

L-ラムノースイソメラーゼは各種の微生物から単離され、それをコー
ドする遺伝子の配列も報告されている。本発明は、土壌より分離したバ
クテリア (Pseudomonas stutzeri) のL-ラムノースイソメラーゼをコー
20 ドする遺伝子配列を決定したところ、これまで報告されている遺伝子配
列との相同性のないもので、遺伝子的にも、蛋白質的に新規なものであ
ることが明らかとなったものである。

この配列を利用して遺伝子操作を利用した希少糖に生産や各
種遺伝子工学的手法を用いた用途に利用できるものである。

25 2. 従来の未利用資源、特に植物性バイオマス（例えば木材や各種
未利用植物資源等）の有効利用は、それをフード糖へ加水分解しそれを

アルコールへと変換することが大きな目標であった。しかしアルコールへ変換しても付加価値が低いため実用化は無理であった。本発明の特徴は、ブドウ糖等単糖へ変換するところまでは従来法と同じであるが、それから先が酵母によるアルコール発酵ではなく、各種生物反応による希少糖への変換である。これによって、アルコールという付加価値の低いものから、希少糖という付加価値の高いものを生産することを可能にするプロセスを提供することができる。

3. 多糖（未利用植物性資源に無尽蔵に存在する）を原料として、部分分解する方法等により、オリゴ糖が生産できる。これも機能性のある付加価値のあるものとして用途が開発されている。しかし、単糖という最小単位にまで分解するともう新しい展開はないと考えられていた。それを打破したのが、ひとつの単糖（希少糖）から新しい単糖（希少糖）へと次々に変換することを目標とした生産戦略ができたことが大きな意義と考えている。多糖を分解すると単糖になる、それを原料として次々に単糖（希少糖）を生産するという発想の新しさである。多糖は、上流の原料であり、それを分解して単糖として原料とするということである。これは、原料がたとえ、木（セルロース）であろうと、でんぶんであろうと、何であろうと、どんなに異なった多糖であろうと単糖まで分解すれば同じものとなるということがその基本的戦略である。

4. 第1図から理解できることは、単糖は、炭素数4、5、6全てがつながっているということである。イズモリングC6の中でのつながりと、C4、C5、C6が全てつながっていることである。この考え方は重要である。炭素数を減少させるには主に発酵法を用いる。炭素数の異なる単糖全てをつなぐという大きな連携図であることも特徴である。どのような廃棄物あるいは、糖質副産物が得られてもこの図からその利用法を考察することができる。また、利用価値がないということ

も理解することができるのである。

5. 単糖に関する研究計画の中で、第1図のように全ての炭素数の異なるものを包括してとらえる考え方は存在しなかった（第10図参照）。個別の反応は、それぞれの目的によって行われてきた。個別の目的で進めてきた研究が総合的に関係づけられることで、相互の技術をつなぎ合わせる方向が見いだせる。たとえば、廃棄物あるいは副産物として邪魔者として扱われてきたものが、単糖であるかぎり、その全てについて価値判断が可能となる。そして何の原料になるかを直ぐに判断できる。このように、単糖全体を図・システムとしてとらえる新しい技術思想を提示することができる。

6. 本発明のこの技術思想は、単糖を見直す、単糖の価値を評価する方法につながってゆく。単糖という一般には「自然界では最も単純な有機物」という概念を、単糖全体を考慮に入れることで、複雑でしかも可能性が大きく広がる有機物であることを直感できるシステムにつながる。

15 7. 「単糖はこれだけしかない」、「単糖はこれが全てである」ということを認識できることの重要性がある。逆の見方からすると、これだけ全部を研究することで単糖全体を知ることが可能であるという研究計画を明確にできることを示している。限界を知ることは、可能性を知ることになるのである。

20 8. 本発明は、希少糖の生産分野ばかりではなく、希少糖の持つ生理活性を探索する研究においても有効性を発揮する。例えば、ある希少糖に生理活性が判明したとき、第1図で示される連携図の存在位置を確認する。そして構造の近い希少糖に関する生理活性との比較、あるいは、構造的に鏡像関係にある希少糖の生理活性を検討することで、生理活性の機構を分子の構造から類推する助けになるであろう。また、これまでランダムに試行錯誤に研究していた生理活性の研究を、イズモリングの

全体像を把握することを基盤として、計画的に進めることに優位に利用できることが期待される。

9. 本発明は希少糖の生産戦略としての有用性および、その用途、特に生理活性の研究においても有用性を發揮する。これは、従来の構造のみからの単糖の羅列的分類と個別的認識法から、酵素反応による個々の単糖の連結という生産面での体系化が可能となったこと。さらに、希少糖の生理機能を解析し、イズモリング上に性質を集積することにより、これまで単純な羅列的理解から、単糖全体を、「単糖の構造」、「単糖の生産法」、および「単糖の生理機能」を包括的に理解することに大いに利用できると期待される。

10. 本発明において明らかとなったL-ラムノースイソメラーゼの新規触媒反応を含めて全ての異性化反応を、イズモリングの第7図、第8図、第9図に示した。図から明らかなように、イズモリングを用いて異性化反応を整理することが全体を理解する手段として如何に有効であるかを示している。さらに、L-ラムノースイソメラーゼが単糖の多くを基質とすることが理解できる。

すなわち、活性の大小はあるものの、L-ラムノースイソメラーゼが触媒することが確認された異性化反応は第7図中太い線で示したものである。一方、異性化反応が確認できなかったものは、太い点線で示した4種であることが一目瞭然に理解できる。

また、第8図、第9図に示すように、これも活性の大小はあるものの、ペントースおよびテトロースにおける全異性化活性を持つことを示している。

11. このようにイズモリングを利用することで、L-ラムノースイソメラーゼの触媒する反応を明確に示すことができると同時に、反応が確認できないものを明確に認識することが可能である。

12. 新しく確認された各種の異性化活性はアルドースからの反応と、ケトースからの反応の結果が若干異なるなど詳細な反応機構を検討すること必要があるが、第7図、第8図、第9図が示すように非常に多くの希少糖の生産に利用できる可能性を持つことが明らかとなった。

5

10

15

20

25

請 求 の 範 囲

1. 以下の(a)または(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

5 (b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、L-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質。

2. 配列番号1に示される塩基配列若しくはその相補的配列またはこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなるDNA。

10 3. 請求項2記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつL-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

4. Pseudomonas stutzerii 由来のL-ラムノースイソメラーゼである請求項1、2または3のDNA。

15 5. 上記のL-ラムノースイソメラーゼは、以下の物理化学的性質を有する酵素である請求項4のDNA。

(イ) 作用

第7図、第8図、第9図に太い黒線で示される異性化反応を触媒する。

(ロ) 作用pHおよび至適pH

20 作用pHは7.0～10.0であり、至適pHは9.0である。

(ハ) pH安定性

種々のpHで4℃、1時間保持した場合、pH6.0～11.0の範囲で安定である。

(二) 作用温度および至適温度

25 作用温度は40～65℃であり、至適温度は60℃である。

(ホ) 温度安定性

40°C、10分では安定しており、50°C、10分でも90%以上残存している。

(ヘ) キレート剤の影響

キレート剤であるEDTA、EGTAを活性測定時に共存させても、

5 ほとんど活性は阻害されない。

(ト) 金属イオンの影響

1 mMのコバルトイオンにより約30%阻害される。

(チ) SDS-PAGE法による分子量

約43,000である。

10 6. 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

7. 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつL-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質。

15 8. L-ラムノースイソメラーゼ活性は、以下の物理化学的性質によって特定されるものである請求項6または7のタンパク質。

(イ) 作用

第7図、第8図、第9図に太い黒線で示される異性化反応を触媒する。

(ロ) 作用pHおよび至適pH

作用pHは7.0~10.0であり、至適pHは9.0である。

20 (ハ) pH安定性

種々のpHで4°C、1時間保持した場合、pH6.0~11.0の範囲で安定である。

(ニ) 作用温度および至適温度

作用温度は40~65°Cであり、至適温度は60°Cである。

25 (ホ) 温度安定性

40°C、10分では安定しており、50°C、10分でも90%以上残

存している。

(ヘ) キレート剤の影響

キレート剤であるEDTA、EGTAを活性測定時に共存させても、ほとんど活性は阻害されない。

5 (ト) 金属イオンの影響

1 mMのコバルトイオンにより約30%阻害される。

(チ) SDS-PAGE法による分子量

約43,000である。

9. 請求項6、7または8記載のタンパク質と、翻訳開始コドンタン
10 パク質とを結合させた融合タンパク質。

10. 請求項1ないし5のいずれか記載のDNAを含む組換えベクター。

11. 請求項6、7または8記載のタンパク質を発現することができる
発現系を含んでいる宿主細胞。

12. 請求項11の発現系を含んでなる宿主細胞を培地に培養し、得られ
15 る培養物からL-ラムノースイソメラーゼ活性を有する組換えタンパク質
を採取することを特徴とする組換えタンパク質の製造方法。

13. 第1図で示される生産過程と分子構造(D型、L型)により、炭素
数の異なる単糖全てをつなぎ連携図を希少糖生産に利用する方法であ
って、目的とする希少糖の、単糖の全体像中の位置を把握し、請求項6、
20 7、8または9のタンパク質を作用させるその最適な生産経路を設計す
ることを特徴とする方法。

14. 希少糖生産が希少糖大量生産である請求項13の方法。

15. 希少糖生産が未利用資源からの希少糖生産である請求項13または
14の方法。

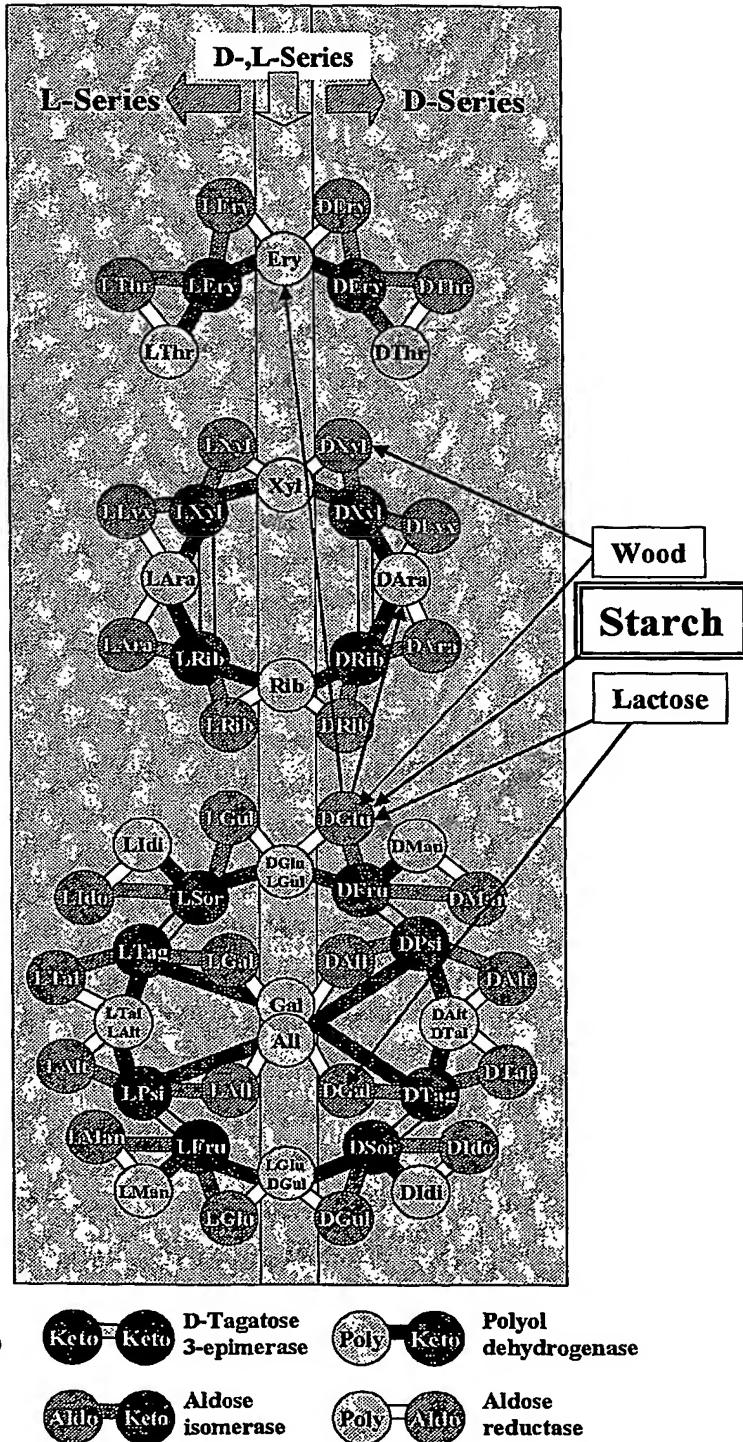
25 16. 目的とする希少糖が、生理活性が判明した希少糖である請求項13、
14または15の方法。

1/10

第1図

イズモリングによる全単糖の生合成戦略

Aldotetrose	DEry D-Erythrose DThr D-Threose LEry L-Erythrose LThr L-Threose
Ketotetrose	DEry D-Erythulose LEry L-Erythulose
Tetritol	Ery D,L-Erythritol (Erythritol) DThr D-Threitol LThr L-Threitol
(Tetroses 9)	
Aldopentose	DRib D-Ribose DAra D-Arabinose DXyl D-Xylose DLyx D-Lyxose LRib L-Ribose LAra L-Arabinose LXyl L-Xylose LLyx L-Lyxose
Ketopentose	DRib D-Ribulose DXyl D-Xylulose LRib L-Ribulose LXyl L-Xylulose
Pentitol	Rib D,L-Ribitol (Ribitol) DAra D-Arabitol Xyl D,L-Xylitol (Xylitol) LAra L-Arabitol
(Pentoses 16)	
Aldohexose	DAll D-Allose DAit D-Altrose DGlu D-Glucose DMan D-Mannose DGul D-Gulose DIdo D-Idose DGal D-Galactose DTal D-Talose LAll L-Allose LAit L-Altrose LGluc L-Glucose LMan L-Mannose LGul L-Gulose LIdo L-Idose LGal L-Galactose LTal L-Talose
Ketohexose	DFru D-Fructose DPsi D-Psicose DSor D-Sorbose DTag D-Tagatose LFru L-Fructose LPsi L-Psicose LSor L-Sorbose LTag L-Tagatose
Hexitol	All D,L-Allitol (Allitol) DAlt,DTal D-Altritol,D-Talitol DGlu,LGul D-Glucitol,L-Gulitol DMan D-Mannitol DGul,LGlu D-Gulitol,L-Glucitol Didi D-Iditol Gal D,L-Galactitol (Galactitol) LAit,LTal L-Altritol,L-Talitol LMan L-Mannitol LIdi L-Iditol
(Hexoses 34)	



第2図

1 ATGGCTGAATTCAAGGATCGCTCAGGATGTCGTTGCGCGGGAAAACGACAGGCGCGCCTCG 60
 1 M A E F R I I A Q D V V A R E N D R R A S 20
 61 GCGCTGAAGGAAGACTACGAGGCCTCGCGCGAATCTCGCCCGCCGTGGCGTCGACATC 120
 21 A L K E D Y E A L G A N L A R R G V D I 40
 121 GAGGCCGTACGGCCAAGGTGAAAAGTTCTCGTCGCCGTCCCTCCTGGGGCGTCGGC 180
 41 E A V T A K V E K F F V A V P S W G V G 60
 181 ACGGGCGGCACCGCCTTGCGCGCTTCCCGGACCGGGCAGGCCGCGCGGCATCTCGAC 240
 61 T G G T R F A R F P G T G E P R G I F D 80
 241 AAGCTGGACGACTGCGCCGTATCCAGCAGCTGACACGCCACGCCAATGTCTCGCTG 300
 81 K L D D C A V I Q Q L T R A T P N V S L 100
 301 CATATTCCGTGGGACAAGGCCGATCCGAAGGAGCTGAAGGCCAGGGCGACGCCCTCGGC 360
 101 H I P W D K A D P K E L K A R G D A L G 120
 361 CTCGGCTTCGACCGCAGTGAACCTCAATACCTTCTCCGATGCGCCCGGCCAGGCCATTCC 420
 121 L G F D A M N S N T F S D A P G Q A H S 140
 421 TACAAATACGGCTCGCTCAGCCACACGGATGCGGCAACGCCGCCAGGGCTGAGCAC 480
 141 Y K Y G S L S H T D A A T R A Q A V E H 160
 481 AATCTGGAATGCATCGAGATCGGCAAGGCCATCGGCTCCAAGGCCTGACGGTCTGGATC 540
 161 N L E C I E I G K A I G S K A L T V W I 180
 541 GGTGACGGCTCCAACCTCCCGGCCAGAGTAACCTCACCAAGGGCTTCGAACGTTATCTC 600
 181 G D G S N F P G Q S N F T R A F E R Y L 200
 601 TCGCGATGGCGGAGATCTACAAGGGCCTGCCGATGACTGGAAGCTGTTCTCGAGCAC 660
 201 S A M A E I Y K G L P D D W K L F S E H 220
 661 AAGATGTACGAGGCCGCTTCTATTGACCGCTCGTGCAGGACTGGGCACGAATTATCTC 720
 221 K M Y E P A F Y S T V V Q D W G T N Y L 240
 721 ATCGCCCAAGACGCTCGGCCCAAGGCCAGTCGCTCGATCTCGCCATCACGCCCG 780
 241 I A Q T L G P K A Q C L V D L G H H A P 260
 781 AACACCAATATCGAGATGATCGTCCGGCTCATCCAGTCGGCAAGCTCGGGCTTC 840
 261 N T N I E M I V A R L I Q F G K L G G F 280
 841 CATTCAACGATTCCAATACGGCGACGACGACCTCGATGCCGGCCATCGAGCCCTAT 900
 281 H F N D S K Y G D D D L D A G A I E P Y 300
 901 CGCCTTCCCTCGTCTTCAACGAGCTGGTGGATGCGGAGGCCGCGCGTCAAGGGCTTC 960
 301 R L F L V F N E L V D A E A R G V K G F 320
 961 CACCCGGCCCACATGATCGACCAGTCGACAAACGTCACCGAACCGATCGAGAGCCTGATC 1020
 321 H P A H M I D Q S H N V T D P I E S L I 340
 1021 AACAGCGCGAACGAAATCCGTCGCGCTATGCGCAGGCCCTCCTGTCGACCGCGCG 1080
 341 N S A N E I R R A Y A Q A L L V D R A A 360
 1081 CTTCCGGCTACCAGGAGGACAACGACGCCCTGATGGCGACGGAAACGTTGAAGCGCGCC 1140
 361 L S G Y Q E D N D A L M A T E T L K R A 380
 1141 TACCGTACCGATGTGGAGGCCGATCCTCGCCGAGGCCGCCGACGGGCCGGCGCC 1200
 381 Y R T D V E P I L A E A R R R T G G A V 400
 1201 GACCCCGTCGCGACCTATCGGGCCAGCGGCTACCGCGCCAGGGTCGCCGCCAGCGCCCC 1260
 401 D P V A T Y R A S G Y R A R V A A E R P 420
 1261 GCCTCCGTGCGGGTGGCGGCCATCATCTGA 1293
 421 A S V A G G G G I I * 431

3/10

第3図

---AEFRIAQDVVARENDRRASAKEDYEALGANLARRGVDTAVTAKVEKFFVA--VP	55
MTIKANYDSAKQAYEKWGIDVEEALRQLEQVPISIHCWQGDDIEGFEVNKGELSGGIDVT	60
SWGVGTGGIRFARFPGTGEPRGIFDKLDDCAVIQQLTRATPNVSLHIPWDKADPKELKAR	115
GNYPGKAQIPEELRRDLEKALSLIPGKHRVNLHAYAETNREAPERDELKPQHFENWVKW	120
GDALGLGF DAMNSNTFSDAPGQAH SYK YGSLSHTDAATRAQAVEHNLEGIEGKAIGSKA	175
AKNLGLGLDFNPTLFSHEKAADGLT-----SHPDPIREFWIRHCIACRRI GEYFGKEL	175
LVWIGDGSNFPQGSNFTR----AFERYLSAMAEY-KGLPDDWKLFS-EHKMYEPAFYS	229
GT PCL TN I WIPDGYKDIPSDRLTPRKPLKESLDRIFSEEISEQHNIDSIESKLFGLGSES	235
TVVQDWGTYNYLIAQTLGPKAQCLVDLGH-HAPNTNIEMINVARLIQFGKLGGFHFND SKY G	288
YVV--GSHEFYLAYATNHKLCLLDTGHFHPTEVSNKISSMILYTDKLA-LIVSRPVRW	292
DDDL DAGAIEPYRLFLVFNLVDAEARGVKGFP AHMIDQSHNVTDPIESLINSANEIRR	348
DSDBVVVLDDELR-----EIALEIVRNHALEKVAIGLDFFDASINRVAWTIGTRNMIK	346
AYAQALLVDR AASGYQEDNDALMATETLKRAYRTDVEPLAEARRRTGGAVDPVATYRA	408
ALLYALLPNGYIKQDIEG RYTERLALMEEFKTYPFGAWDSYCEQMGVPVKEAWLYDI	406
SGYRARVAAERPASVAGGGGII 430	
KEYEQQVLLKRKASSP----IV 424	

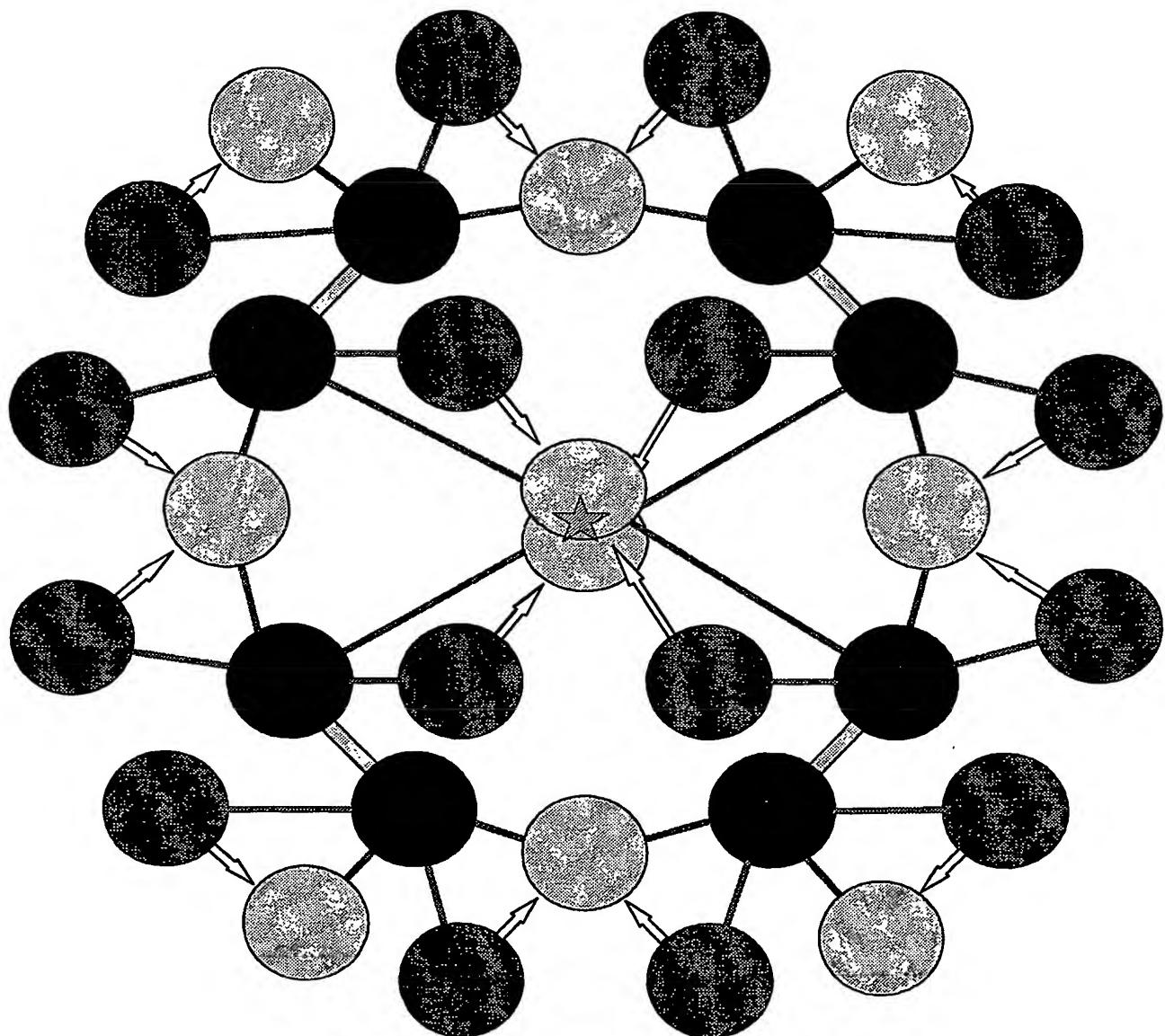
4/10

第4図

Rh1	MAEFR I A Q D V V A R E N D R R A S A L K E D Y E A L G A N L A R R G V D I E A V T A K V E K F F V A V P S I N G V G	60
SISTR	MTE	LA AVKA ALKT QAV E T P S W A Y G
SITHE	MI	N M E R I F K E L D E L K F E L P S I A F S
Rh1	T G G T R F A R F P G T G E P R G I F D K L D D C A V I Q Q L I T R A T P N V S L H I P W D K A - D P K E K A R G D A L	119
SISTR	N S G T R E K V F A Q P G V P R D P F E K L D D A A K V H E F T I G A A P T V A L H I P W D R V E D Y A A A H A E K R	84
SITHE	D A G T R F A V F H E E G A A R N V E R I E D A A L V H R L I G C C P S V A L H I P W D K V E N W E E I R E F A E E K	84
Rh1	G L G F D A M N S N T F S D A P G Q A H S Y K Y G S L S H T D A A T R A Q A V E H N L E C I E I G K A I G S K A L T V W	179
SISTR	G V R I G A I N S N T F Q D D	D Y R L G S I C H P D A A V R R K A V D H I L L E C V D I M D A T G S R D L K L W
SITHE	G L K I G A I N P N L F Q D P	D Y K Y G S L T N P S E K I R K K A I A H V M E C V D I A E K T G S K V I S L W
Rh1	I G D G S N F P G Q S N F T R A F E R Y L S A M A E I V K G L P D D W K L F S E H K M Y E P A F Y S T V V Q D W G T N Y	239
SISTR	F A D G T N Y P G Q D D I R S R Q D R L A E G L A E V Y E R L G E G Q R M I L L E Y K L F E P A F Y T T D V P D W G T A Y	199
SITHE	L A D G T D Y P G Q D D F R S R K K R L E E S L R Y I V E N M P A D M Y L L I E Y K F F E P A F Y H T D I P D W G M S Y	199
Rh1	L I A Q T I G P K A Q C L I V D L G H I A P N T N I E M I V A R L I Q F G K L G G F H F N D S K Y G D D D I D A G A I E P	299
SISTR	A H C L K L I G E K A Q V V V D T G H I A P G T N I E F I I V A T L L R E G K L G G F D F N S R F Y A D D D L M V G A A D P	259
SITHE	L L S E K L I G E R A L V L I V D L G H I P Q G T N I E Y I V A T L L S E K K L G G F H L I N N R K Y A D D D L T I A S I N P	259
Rh1	Y R L F L V F N E L V D A E A R G V K G F H — P A H M I D Q S H N V T D P I E S L I N S A N E I R R A Y A Q A L L V	356
SISTR	F Q L F R I — M Y E V V R G G G F T S D — V A F M L D Q C H N I E A K I P A I I R S V M N V Q E A T A K A L L V	313
SITHE	Y E V E L I F K E I V F A K R D P E L S D S A K K V V L M F D Q A H I T K P K I L A M I Q S V L I A Q E L F T K A L L I	319
Rh1	D R A A I S G Y Q E D N D A L M A T E T I K R A Y R T D V E P I I L A E A R R R T G G A V D P V A T Y R A S G Y R A R V A	416
SISTR	D G T A I A E A Q Q A A G D V L E A N A V L M D A Y N T D V R P L I I R E V R E E S G L D P E P M K A Y R S C G W A E K V V	373
SITHE	D E N R I R E A Q K N Y D V V E A E E I I L D A F R T D V R P I I R E Y R R Q K G L P E D P L R V F R E E D Y M E K R R	379
Rh1	A E R P A S V A G G G G I I	430
SISTR	A E R I G G Q Q A G W G - A	386
SITHE	R E R R	383

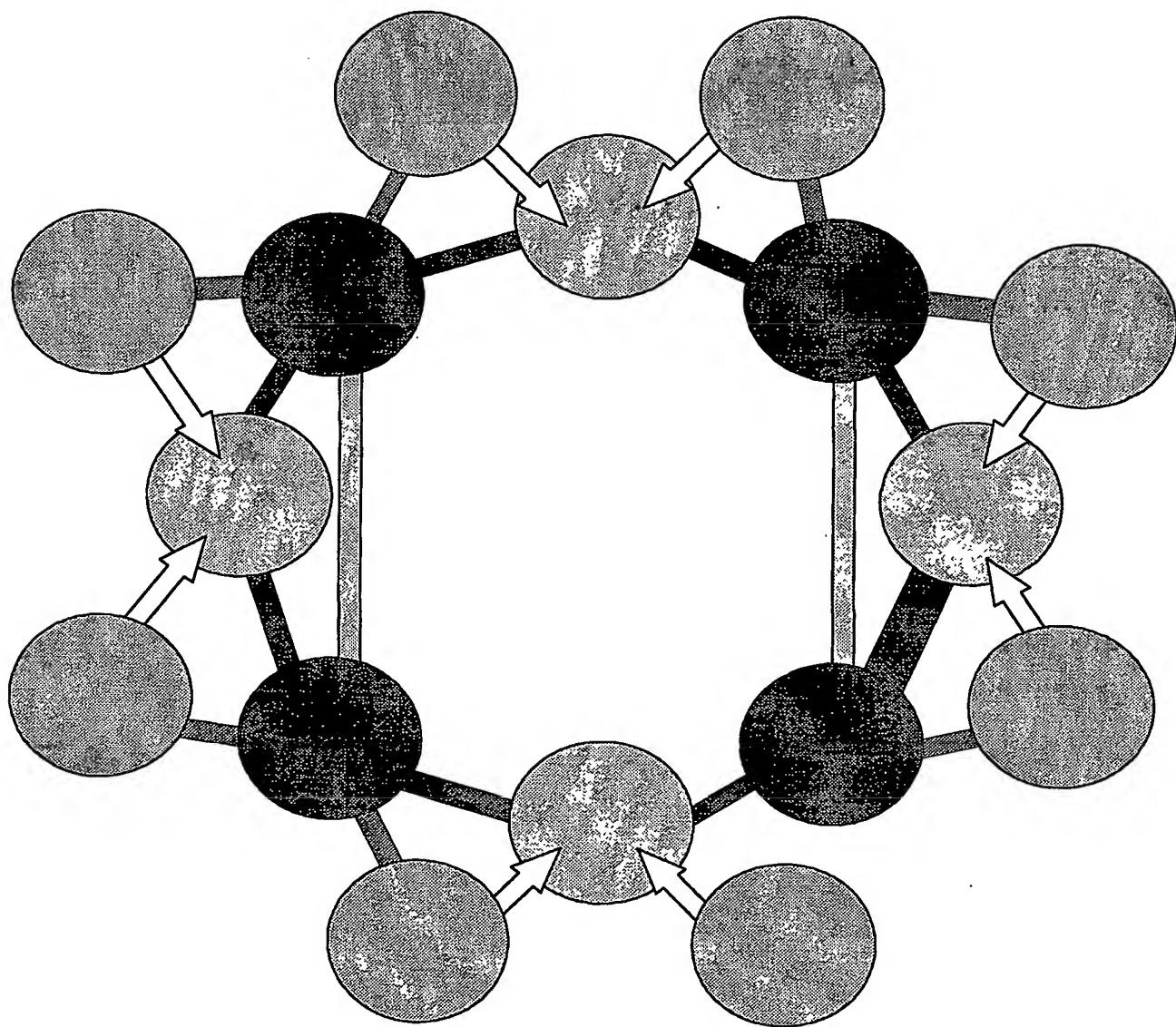
5/10

第5図



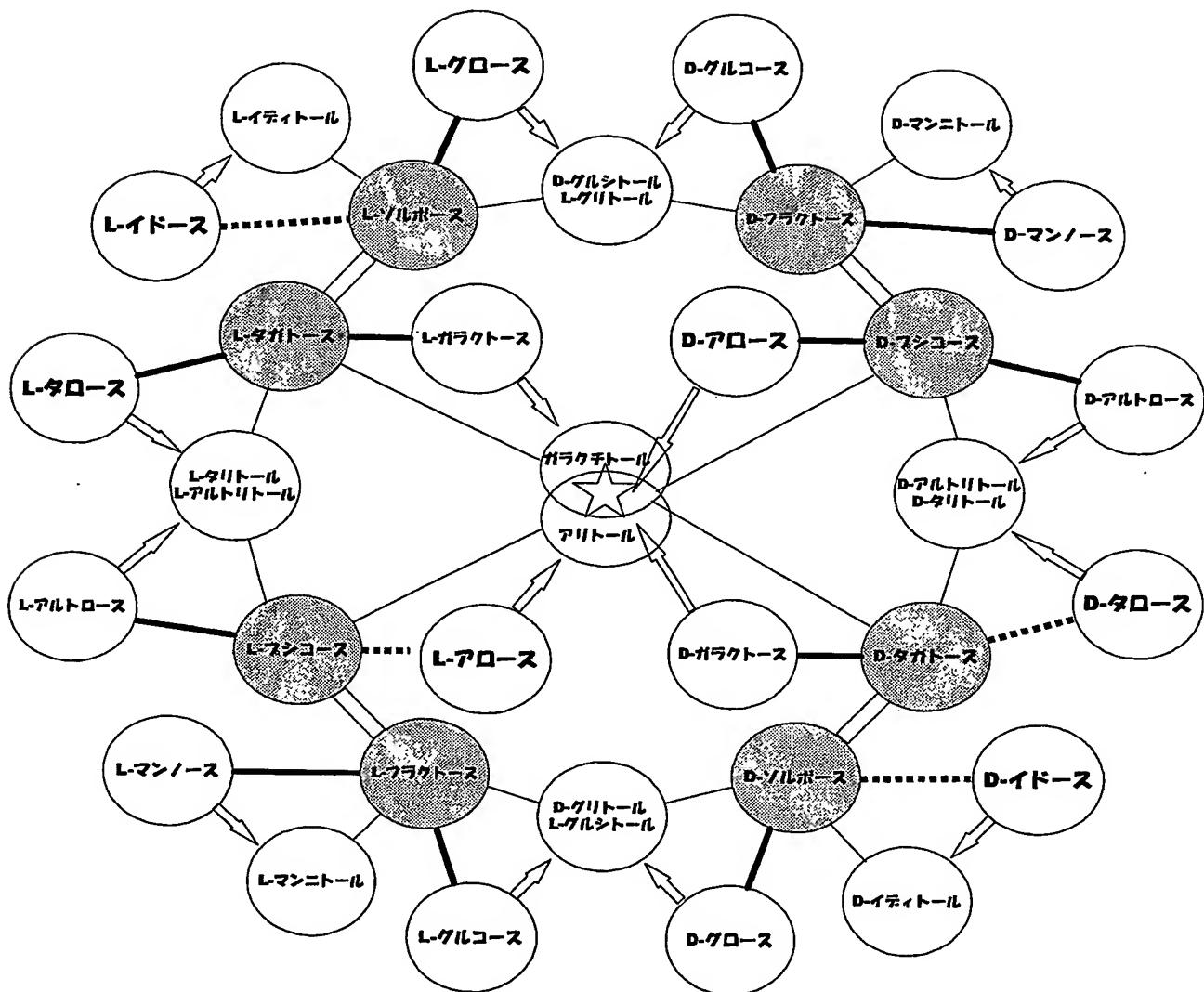
6/10

第6図



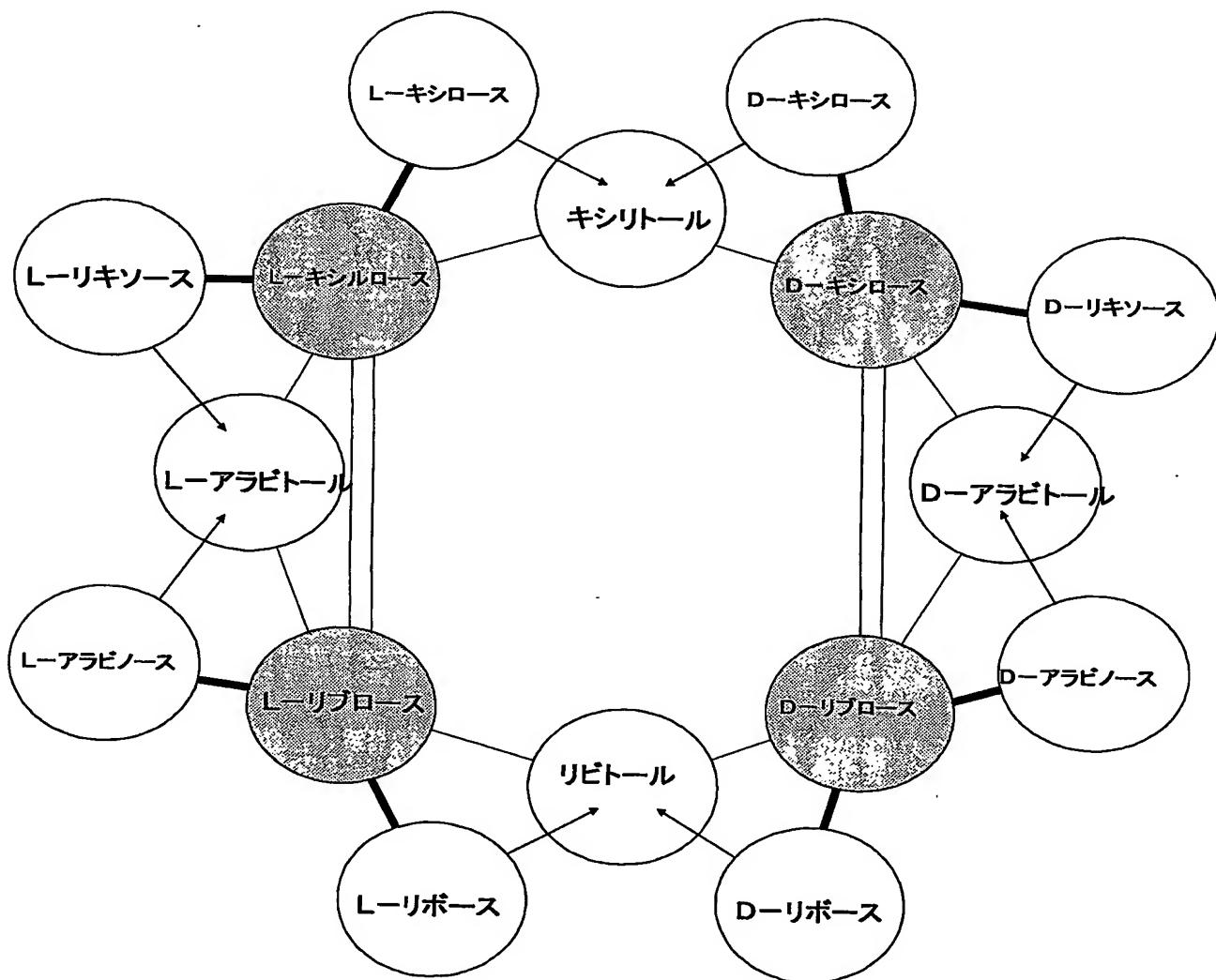
7/10

第7圖



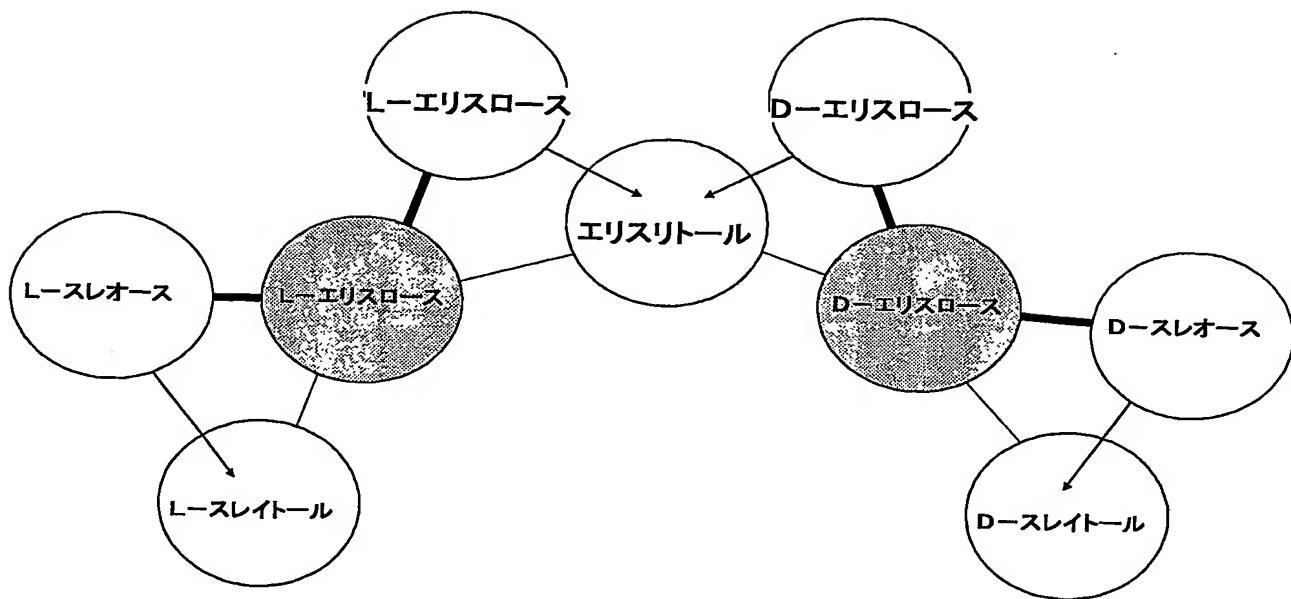
8/10

第8図



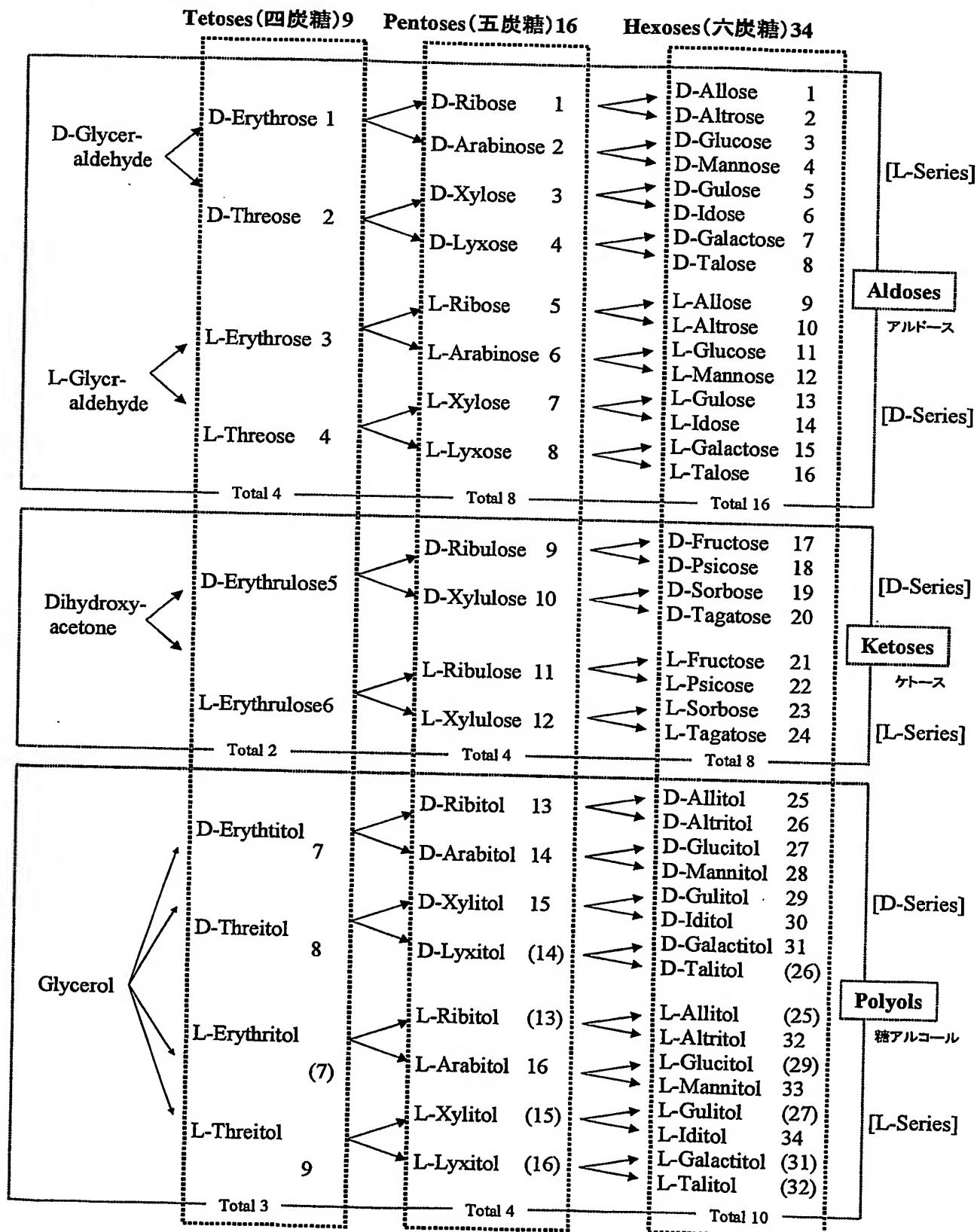
9/10

第9図



10/10

第10図



SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN REPRESENTED BY PRESIDENT OF KAGAWA UNIVERSITY

<120> DNA sequence of L-rhamnose isomerase and its usage

<130> PCT-04-1T01

<160> 2

<210> 1

<211> 1290

<212> DNA

<213> *Pseudomonas stutzeri*

<400> 1

ATG GCT GAA TTC AGG ATC GCT CAG GAT GTC GCG CGG GAA AAC GAC AGG
CGC GCC TCG GCG CTG AAG GAA GAC TAC GAG GCG CTC GGC GCG AAT CTC GCC
60 CGC CGT GGC GTC GAC ATC GAG GCC GTC ACG GCC AAG GTC GAA AAG TTC TTC
CGC GCC GTC CCC TCC TGG GGC GTC GGC ACG GGC GGC ACG CGC TTT GCG CGC
120 TTC CCC GGC ACC GGC GAG CCG CGC GGC ATC TTC GAC AAG CTG GAC GAC TGC
180 GCC GTC ATC CAG CAG CTG ACA CGC GCC ACG CCC AAT GTC TCG CTG CAT ATT
240 CCG TGG GAC AAG GCC GAT CCG AAG GAG CTG AAG GCC AGG GGC GAC GCC CTC
300 GGC CTC GGC TTC GAC GCG ATG AAC TCC AAT ACC TTC TCC GAT GCG CCC GGC
360 CAG GCG CAT TCC TAC AAA TAC GGC TCG CTC AGC CAC ACG GAT GCG GCA ACG
420 CGC GCC CAG GCG GTC GAG CAC AAT CTG GAA TGC ATC GAG ATC GGC AAG GCC
480 ATC GGC TCC AAG GCG CTG ACG GTC TGG ATC GGT GAC GGC TCC AAC TTC CCC
540 GGC CAG AGT AAC TTC ACC AGG GCT TTC GAA CGT TAT CTC TCG GCG ATG GCG
600 GAG ATC TAC AAG GGC CTG CCG GAT GAC TGG AAG CTG TTC TCC GAG CAC AAG
660 ATG TAC GAG CCG GCC TTC TAT TCG ACC GTC GTG CAG GAC TGG GGC ACG AAT
720 TAT CTC ATC GCC CAG ACG CTC GGC CCC AAG GCC CAG TGC CTC GTC GAT CTC
GGC CAT CAC GCG CCG AAC ACC AAT ATC GAG ATG ATC GTC GCC CGG CTC ATC
780 CAG TTC GGC AAG CTC GGC GGC TTC CAT TTC AAC GAT TCC AAA TAC GGC GAC
840 GAC GAC CTC GAT GCC GGC GCC ATC GAG CCC TAT CGC CTC TTC CTC GTC TTC
900 AAC GAG CTG GTG GAT GCG GAG GCG CGC GGC GTC AAG GGC TTC CAC CCG GCC
960 CAC ATG ATC GAC CAG TCG CAC AAC GTC ACC GAC CCG ATC GAG AGC CTG ATC

AAC AGC GCG AAC GAA ATC CGT CGC GCC TAT GCG CAG GCC CTC CTT GTC GAC ¹⁰²⁰
 CGC GCG GCG CTT TCC GGC TAC CAG GAG GAC AAC GAC GCC CTG ATG GCG ACG
¹⁰⁸⁰
 GAA ACG TTG AAG CGC GCC TAC CGT ACC GAT GTG GAG CCG ATC CTC GCC GAG
¹¹⁴⁰
 GCC CGC CGC CGC ACG GGC GGC GCC GTC GAC CCC GTC GCG ACC TAT CGG GCC
¹²⁰⁰
 AGC GGC TAC CGC GCC AGG GTC GCC GAG CGC CCC GCC TCC GTC GCG GGT
¹²⁶⁰
 GGC GGC GGC ATC ATC
¹²⁹⁰

<210> 2

<211> 430

<212> PRT

<213> Pseudomonas stutzerii

<400> 2

Met Ala Glu Phe Arg Ile Ala Gln Asp Val Val Ala Arg Glu Asn Asp Arg Arg
 1 5 10 15
 Ala Ser Ala Leu Lys Glu Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala Asn Leu Ala Arg Arg
 20 25 30 35
 Gly Val Asp Ile Glu Ala Val Thr Ala Lys Val Glu Lys Phe Phe Val Ala Val
 40 45 50
 Pro Ser Trp Gly Val Gly Thr Gly Thr Arg Phe Ala Arg Phe Pro Gly Thr
 55 60 65 70
 Gly Glu Pro Arg Gly Ile Phe Asp Lys Leu Asp Asp Cys Ala Val Ile Gln Gln
 75 80 85 90
 Leu Thr Arg Ala Thr Pro Asn Val Ser Leu His Ile Pro Trp Asp Lys Ala Asp
 95 100 105
 Pro Lys Glu Leu Lys Ala Arg Gly Asp Ala Leu Gly Leu Gly Phe Asp Ala Met
 110 115 120 125
 Asn Ser Asn Thr Phe Ser Asp Ala Pro Gly Gln Ala His Ser Tyr Lys Tyr Gly
 130 135 140
 Ser Leu Ser His Thr Asp Ala Ala Thr Arg Ala Gln Ala Val Glu His Asn Leu
 145 150 155 160
 Glu Cys Ile Glu Ile Gly Lys Ala Ile Gly Ser Lys Ala Leu Thr Val Trp Ile
 165 170 175 180
 Gly Asp Gly Ser Asn Phe Pro Gly Gln Ser Asn Phe Thr Arg Ala Phe Glu Arg
 185 190 195
 Tyr Leu Ser Ala Met Ala Glu Ile Tyr Lys Gly Leu Pro Asp Asp Trp Lys Leu
 200 205 210 215
 Phe Ser Glu His Lys Met Tyr Glu Pro Ala Phe Tyr Ser Thr Val Val Gln Asp
 220 225 230
 Trp Gly Thr Asn Tyr Leu Ile Ala Gln Thr Leu Gly Pro Lys Ala Gln Cys Leu
 235 240 245 250
 Val Asp Leu Gly His His Ala Pro Asn Thr Asn Ile Glu Met Ile Val Ala Arg
 255 260 265 270
 Leu Ile Gln Phe Gly Lys Leu Gly Gly Phe His Phe Asn Asp Ser Lys Tyr Gly
 275 280 285

Asp Asp Asp Leu Asp Ala Gly Ala Ile Glu Pro Tyr Arg Leu Phe Leu Val Phe
290 295 300 305
Asn Glu Leu Val Asp Ala Glu Ala Arg Gly Val Lys Gly Phe His Pro Ala His
310 315 320
Met Ile Asp Gln Ser His Asn Val Thr Asp Pro Ile Glu Ser Leu Ile Asn Ser
325 330 335 340
Ala Asn Glu Ile Arg Arg Ala Tyr Ala Gln Ala Leu Leu Val Asp Arg Ala Ala
345 350 355 360
Leu Ser Gly Tyr Gln Glu Asp Asn Asp Ala Leu Met Ala Thr Glu Thr Leu Lys
365 370 375
Arg Ala Tyr Arg Thr Asp Val Glu Pro Ile Leu Ala Glu Ala Arg Arg Arg Thr
380 385 390 395
Gly Gly Ala Val Asp Pro Val Ala Thr Tyr Arg Ala Ser Gly Tyr Arg Ala Arg
400 405 410
Val Ala Ala Glu Arg Pro Ala Ser Val Ala Gly Gly Gly Gly Ile Ile
415 420 425 430

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000131

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N1/21, C12N9/90

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N1/00-C12N15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN), GenBank/DBJ/EMBL/GenSeq,
SwissProt/PIR/GenSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim N°.
X	Bhuiyan, S.H., et al., Preparation of L-Talose and D-Gulose from L-Tagatose and D-Sorbose, Respectively, Using Immobilized d-Phamnose Isomerase., J.Biosci.Bioeng., 1999, Vol.88, No.5, pages 567 to 570	1-12
X	Bhuiyan, S.H., et al., Immnobilization of L-Pham nose Isomerase and Its Application in L-Mannose Production from L-Fructose., J.Ferment.Bioeng., 1997, Vol.84, No.6, pages 558 to 562	1-12
X	Bhuiyan, S.H., et al., D-Allose Production from D-Psicose Using Immobilized L-Phamnose Isomerase., J.Ferment.Bioeng., 1998, Vol.85, No.5, pages 539 to 541	1-12

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 March, 2004 (19.03.04)Date of mailing of the international search report
06 April, 2004 (06.04.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000131

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Bhuiyan, S.H., et al., Isolation of an L-Rhamnose-Isomerase-Constitutive Mutant of <i>Pseudomonas</i> .sp. Strain LL 172; Purification and Characterization of the Enzyme., <i>J.Ferment.Bioeng.</i> , 1997, Vol.84, No.4, pages 319 to 323	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/000131

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - in written format
 - in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in computer readable form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/000131

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 13-16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in claims 13 to 16 pertain to "scheme or methods of performing purely mental act" and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int C17 C12N15/09, C12N1/21, C12N9/90

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int C17 C12N1/00-C12N15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPI(STN)
GenBank/DDJB/EMBL/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Bhuiyan, S. H., et al., Preparation of L-Talose and D-Gulose from L-Tagatose and D-Sorbitose, Respectively, Using Immobilized d-Rhamnose Isomerase. J. Biosci. Bioeng., 1999, Vol.88, No.5, pp567-570	1-12
X	Bhuiyan, S. H., et al., Immobilization of L-Rhamnose Isomerase and Its Application in L-Mannose Production from L-Fructose. J. Ferment. Bioeng., 1997, Vol.84, No.6, pp558-562	1-12

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 03. 2004

国際調査報告の発送日

06. 4. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 春井一郎

4B 9636

電話番号 03-3581-1101 内線 3446

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	Bhuiyan, S. H., et al. D-Allose Production from D-Psicose Using Immobilized L-Rhamnose Isomerase. J. Ferment. Bioeng., 1998, Vol.85, No.5, pp539-541	1-12
X	Bhuiyan, S. H., et al., Isolation of an L-Rhamnose Isomerase-Constitutive Mutant of Pseudomonas, sp. Strain LL172: Purification and Characterization of the Enzyme. J. Ferment. Bioeng., 1997, Vol.84, No.4, pp319-323	1-12

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ 配列表

配列表に関連するテーブル

b. フォーマット 書面

コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる

この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 13-16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲13-16に記載されている発明は、「純粋に精神的な行為の遂行に関する計画又は方法」に関するものであるから、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.